

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Václav Vobruba

Název práce: Plicní biotrauma

Title: Lung Biotrauma

Typ závěrečné práce: disertační

Vedoucí práce/školicel: prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 18. 1. 2013

MUDr. Václav Vobruba

Identifikační záznam:

VOBRUBA, Václav. Plicní biotrauma [Lung Biotrauma]. Praha 2013, 73 s., 3
příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika dětského
a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK. Vedoucí práce: prof. MUDr. Pavel
Martásek, DrSc.

Poděkování

Rád bych poděkoval prof. MUDr. Pavlu Martáskovi, DrSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky a za poskytnutí laboratorního zázemí během mého doktorandského studia. Poděkování patří i doc. MUDr. Jiřímu Kobrovi, PhD. zejména za pomoc a možnost provádět experimenty na pracovišti plzeňské lékařské fakulty. Zároveň děkuji některým kolegům na pracovišti za pomoc při experimentu, laboratorním zpracování vzorků a podpoře při realizaci předložené práce.

Velkou oporou byla pro mě moje manželka Jitka. Bez její trpělivosti, pochopení a vytvoření rodinného zázemí by tato práce jen obtížně vznikala. Mnohokrát jí za to děkuji.

Obsah

1. Seznam použitých zkratek.	6
2. Úvod.	8
3. Fyziologické poznámky.	13
3.1 Pneumocyty I. typu – alveolární typ I.	13
3.2 Pneumocyty II. typu – alveolární typ II.	20
3.3 Myofibroblasty.	25
3.5 Plicní makrofágy.	26
3.6 Polymorfonukleární leukocyty.	27
4. Vývoj pojmu barotrauma, volumotrauma a biotrauma. Patofyziologické poznámky.	28
4.1 Vznik zánětlivé odpovědi na umělou plicní ventilaci.	30
4.2 Vliv mechanotransdukce na tvorbu cytokinů.	33
5. Cíl a hypotéza práce.	36
6. Metodika.	37
6.1 Experimentální zvířata.	37
6.2 Bronchoalveolární laváž a zpracování získaného materiálu.	38
6.3 Molekulárně biologické a biochemické metody.	39
6.4 Statistické zpracování.	40
7. Výsledky.	41
7.1 Sledování srdeční frekvence (HR-heart rate).	41
7.2 Monitorování hodnot krevního tlaku.	42
7.3 Dynamika změn plicní poddajnosti.	44
7.4. Určení produkce indukibilní nitric oxid syntázy (iNOS).	45
7.5. Stanovení hladin nitrátů/nitritů.	47
7.6 Sledování dynamiky IL-8.	48
7.7 Průkaz dynamiky hodnot TNF- α	49
7.8 Sledování dynamiky hodnot MIP-1 β	50
7.9 Patologickoanatomické vyšetření plicní tkáně.	51
8. Diskuze.	54
8.1 Vliv UPV na některé vitální a plicní funkce.	54

8.2 Vztah UPV k produkci cytokinů, chemokinů iNOS a nitritů/nitrátů.	55
9. Závěr.	60
10. <i>Přínos práce pro rozvoj vědní disciplíny a klinickou praxi.</i>	62
11. <i>Seznam použité literatury.</i>	63
12. <i>Přílohy.</i>	72

1. Seznam použitých zkratk.

ABP	arterial blood pressure (arteriální tlak)
ALI	acute lung injury (akutní plicní postižení)
AMP	adenozinmonofosfát
AQP	aquaporiny
ARDSy	adult respiratory distress syndrom
AT I	alveolární typ buněk I
AT II	alveolární typ buněk II
ATP	adenozintrifosfát
BAL	bronchoalveolární laváž
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Cl	plicní compliance
CVP	central venous pressure (centrální žilní tlak)
CXC	chemokiny
CŽK	centrální žilní katétr
ECMO	extrakorporální membránová oxygenace
FiO ₂	fraction of inspired of oxygen (frakce kyslíku ve vydechované směsi)
GM-CSF	granulocyte macrophage stimulating factor (granulocytární-makrofágový stimulační faktor)
HR	heart rate (srdeční frekvence)
ICAM	intracellular adhesion molecules (intracelulární adhezivní molekuly)
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukiny
iNOS	inducibilní nitric oxid syntáza
LPS	lipopolysacharid
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogen aktivující protein kináza)

MCP-1	monocyte chemotactic protein 1 (monocytární chemotaktický protein 1)
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein 1 β (makrofágový inflamatorní protein 1 β)
NF- κ B	nukleární faktor κ B
NO	oxid dusnatý
PDGF	platelet derived growth factor (trombocyty produkováný růstový faktor)
PEEP	positive end expiratory pressure
PMN	polymorfonukleáry
PPARs	peroxisome proliferator-activated receptors (receptory aktivované proliferátory peroxizomů)
RR	respiratory rate (dechová frekvence)
SP(A,B,C,D)	specifické proteiny (A,B,C,D)
SpO ₂	pulzní oxymetrie
TGF-1 β	transforming growth factor 1 β (transformační růstový faktor 1 β)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TV	tidal volume (dechový objem)
UPV	umělá plicní ventilace
VILI	ventilator induced lung injury (ventilátorem navozené plicní poškození)

2. Úvod.

Umělá plicní ventilace (UPV) je základní metoda léčby respirační insuficience, která patří dnes k rutinním postupům v moderní intenzivní péči. Současné přístroje vybavené moderní elektronikou umožňují provádět UPV relativně šetrným způsobem. Platí to pro režimy s řízenou ventilací, kdy nemocný spontánně nedýchá, nebo jeho vlastní dechová aktivita je nežádoucí a zároveň i pro režimy, kdy je spontánní dechová aktivita zachována a jednotlivé nebo všechny vlastní dechy jsou podpořeny s minimální časovou prodlevou a přizpůsobením se vlastnostem respiračního aparátu. I přes uvedená pozitiva je nutné připomenout, že každý způsob UPV pozitivním přetlakem je nefyziologický ve vztahu k plicní tkáni a vyvolává komplexní patofyziologický proces vedoucí v konečné fázi k rozvoji místní zánětlivé reakce. Za určitých podmínek, zvláště je-li při UPV použito vysokých dechových objemů, může spuštěná zánětlivá reakce přestoupit z plicní tkáně i na ostatní orgány a vyvolat jejich dysfunkci s následným rozvojem multiorgánového selhání.

Předložená experimentální práce si stanovila za cíl zjistit, v jakém časovém intervalu od zahájení UPV dojde ke zvýšení některých prozánětlivých cytokinů a chemokinů ve vztahu ke způsobu vedení UPV a jak rychle dojde ke zhoršení plicních funkcí a oběhové dysfunkci při UPV vedené vysokými dechovými objemy. Vzhledem k anatomické a patofyziologické podobnosti kardiovaskulárního a respiračního systému byl experiment proveden na praseti bílém.

2.1 Historické poznámky k vývoji umělé plicní ventilace.

Se snahou pomoci nemocnému při dechové nedostatečnosti se setkáváme v dávné historii. S prvními poznámkami týkající se resuscitace dechu a zvl. pak pomůcek používaných k zajištění průchodnosti dýchacích cest najdeme ve starověkém egyptském písemnictví. Z období Nové říše (1550 – 1100 př. Kr.) pochází Huneferův papyrus (kolem r. 1370 př. Kr.), kde jsou zobrazovány nástroje používané k rituálu „otevírání úst“. Nástroj v ruce kněze nápadně připomíná Magillův a Jacksonův laryngoskop tvaru U z první poloviny 20. století (obr. 1). V egyptském muzeu v Káhiře je na podstavci sochy kněze Džed-Hor nápis, který v překladu zní:

„Kněz bohyně Sachmet, ten, který připravuje cestu k oživení mrtvého, který dodává vzduch do uzavřeného nosu toho, kdo je bez dechu, aby ho oživil pohybem svých paží a prováděním všech metod“. Podle některých pramenů je možné se domnívat, že staří Egypťané dokázali provádět



Obr.1 .Rituál otevírání úst

tracheotomii. Podle některých legend zaváděli rákos do průdušnice skrz otvor v kůži. Ve starožidovském písemnictví se nacházejí zmínky o schopnosti Hebrejců rozpoznávat důležitost dýchání z úst do úst. Jednou z nich je i údaj o tom, že hebrejská porodní bába Puah byla schopna oživovat děti vlastním dechem. Významný pokrok zaznamenala antická věda. Galénos popsal význam neporušené pleury pro normální funkci plic (Anatomical Procedures) a použil dmýchací vak k nafouknutí plic mrtvého zvířete. Homér se zmiňuje o otevření průdušnice řezem, který vedl k úlevě u dusících se osob. Na práci Galéna navázal ve středověku Andreas Vesalius, který byl profesorem anatomie v Padově. V roce 1543 publikoval v Basileji práci *De corporis humani fabrica libri septem*. Doslova uvádí: “Život zvířete může být navrácen, je-li otevřena

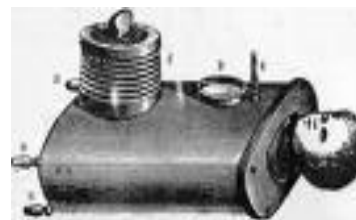
trachea, do níž je vložena rákosová nebo třtinová trubička. Pokud budeš do ní foukat tak, že plíce se budou opět rozpínat a zvíře může přijímat vzduch... Když jsou plíce nafukovány v intervalech, pohyb srdce a artérií se nezastaví“. Publikované pokusy prováděl na prasnicích. Období osvícenství přineslo objev kyslíku (Joseph Priestley a Carl Scheele) a jeho izolaci (Antoine Lavoisier). V roce 1744 britský chirurg Tossach popsal královské společnosti v Londýně způsob, který oživil horníka uhelného dolu. Použil metodu insuflace z úst do úst a je to zřejmě první zpráva o praktickém použití dýchání z úst do úst u dospělých. U nás jsou zmínky o používání uvedené metody v pracích hraběte Leopolda Berchtolda, který se věnoval lékařství a přírodovědě.

Zlom ve vývoji dýcháním pozitivním přetlakem přinesl Leroy d'Etoile, který referoval francouzské Akademii věd o nežádoucích účincích zvýšeného tlaku v dýchacích cestách, které vedou k ruptuře alveolů, emfyzému a rozvoji tenzního pneumotoraxu. Obavy z uvedených poznatků vedly k odklonu od přetlakové ventilace. V r. 1837 byla dokonce tato metoda z resuscitačních doporučení britské The Royal Humane Society stažena a ke slovu přišly metody, které používaly pozitivní tlaky na hrudník v expirační fázi. Techniky manuální podpory byly většinou pojmenovány podle svých objevitelů (Silvestr, Hall, Howard, Schafer atd.) a používaly se až do poloviny 50. let 20. století, kdy pod vlivem prací srovnávající jejich účinnost s účinností dýchání z úst do úst (Safar, Elam, Gordonn) byly definitivně opuštěny.

S rozvojem názorů na jednotlivé způsoby vedení umělé plicní ventilace se rozvíjely i přístroje. Představitelem umělé ventilace pomocí aplikace vnějšího tlaku na hrudník a břicho byl Alfred E. Jones, který v roce 1864 sestrojil dutinový ventilátor pracující na principu vnějšího negativního tlaku. Přerušovaný vnější negativní tlak použil při konstrukci ventilátoru skotský lékař John Dalziel Drumlanrig. Jeho funkci popsal v článku „On sleep and an apparatus for promoting artificial respiration“. Tělo

pacienta, kromě hlavy a krku, bylo umístěno ve schránce v poloze vsedě. Podtlak byl vytvářen dvojicí měchů, které byly poháněny pístem. Po stranách schránky byla dvě okna, která umožňovala sledovat pohyby hrudníku. Alfred

Woillez sestrojil v r. 1876 ventilátor nazvaný Spiroscope a o rok později zdokonalený Spirophore jehož funkce byla publikována v Lancetu (obr. 2). Negativní tlak v komoře,



Obr.2. Ventilátor Spirophore

ve které bylo umístěno tělo nemocného v horizontální poloze, byl vyvíjen pomocí měchů na ruční pohon. Některé

tyto přístroje byly umístěny na břehu řeky Seiny v Paříži a sloužily k záchraně tonoucích. V r. 1931 John Emerson

vyvinul železné plíce, které fungovaly na stejném principu jako Woillezův model, ale byl již opatřen elektromotorem.

Komplikace, které vznikaly při umělé plicní ventilaci prováděné změnou tlaku na hrudník (zhoršený žilní návrat,



Obr. 3. Ventilátor Pulmotor

obtížně udržovatelná průchodnost dýchacích cest, nesnadné ošetřování nemocného)

byly důvodem v polovině 50. let minulého století zániku této metody. Významné místo ve vývoji přístrojů pro dýchání přetlakem byl Fellův-O'Dwyerův aparát. Šlo vlastně o

předzvěst neinvazivní ventilace, kdy byl plyn vháněn do dýchacích cest pacienta přes obličejovou masku a později přes laryngální rourku. V roce 1907 byl vyvinut

Heinrichem Drägreem přístroj (Pulmotor) ke kříšení dechu zejména při důlních neštěstích a při požárech. Ventilátor byl původně poháněn gramofonovým motorem,

později byla vyvinuta modifikace poháněná kyslíkem. Pulmotor byl časově cyklovaný s fixně nastavenou dechovou frekvencí a poměrem inspiria a expiria. Přístroj byl velmi

oblíben zejména u záchranářů a v některých městech USA ho hasiči používali až do poloviny 50. let minulého století (obr. 3). Díky negativním názorům některých

fyziologů na uvedený přístroj nedošlo k jeho rozšíření mezi lékařskou veřejnost. K největšímu rozvoji v konstrukci ventilátorů došlo začátkem 50. let a vyvolávajícím momentem byla velká epidemie bulbo-spinální formy poliomyelitidy v Kodani (obr. 4). Zemřelo 27 z 31 většinou dětských pacientů léčených „železnými plicemi“. Dr. Lassen, šéf infekčního oddělení požádal dr. Ibsena - vedoucího lékaře anestezie - o pomoc. Ten, u 12 leté těžce nemocné dívky se zmíněnou formou, provedl tracheotomii a zajistil dýchací cesty kanylou s obturačním balónem. Dívka byla manuálně ventilována pomocí Watersova systému a její stav se dramaticky zlepšil (obr. 5). Mortalita na bulbo-spinální paralýzu klesla z 80% na 25%. K udržování manuální ventilace u všech pacientů bylo potřeba 1400 studentů pracujících na třísměnný provoz, což vedlo k zastavení provozu univerzity. Došlo k prudkému rozvoji vývoje výroby ventilátorů.



Obr. 4. Pacienti léčení „železnými plicemi“ při epidemii poliomyelitidy



Obr.5. Pacientka s poliomyelitidou manuálně ventilovaná Watersovým systémem

Od 70. let minulého století zasáhla do vývoje pozitivním způsobem elektronika, která umožnila zavedení režimů, které citlivě reagují na spontánní dechové úsilí pacienta. Některé současné ventilátory dokáží přizpůsobit parametry ventilace v důsledku měřené oxémie, kapnie, plicní poddajnosti a rezistence.

3. Fyziologické poznámky.

Vzhledem k zaměření práce jsou fyziologické poznámky směřovány především na oblast alveolárního kompartmentu.

Alveoly jsou polyedrické evaginace stěny respiračních bronchiolů. V průměru měří okolo 200 μm a představují slepá zakončení bronchiálního stromu. Současné alveolární paradigma zahrnuje tři vysoce specializované skupiny buněk. Pneumocyty I. typu (AT I - alveolární typ I), jejichž hlavní funkce se uplatňuje při výměně plynů, pneumocyty II. typu (AT II - alveolární typ II), které mají hlavně funkce sekreторické, metabolické, progenitorové a imunologické. Intersticiální fibroblasty tvoří proteiny alveolární proteinové matrix nezbytné pro strukturu alveolů.[1]

3.1 Pneumocyty I. typu – alveolární typ I.

V roce 1952 byla díky elektronové mikroskopii detailně popsána výstelka alveolů, resp. byla popsána přítomnost AT I a AT II [2]. Vzájemné spojení obou typů pneumocytů je vytvořeno v apikálních částech pomocí zonulae ocludens a pomocí desmozomů. Vytvořené intercelulární prostory jsou vyplněné transmembránovými proteiny, které se vzájemně vážou. Do těchto vrstev jsou zakotvena cytokeratinová intermediální filamenta. Podél laterálních stěn sousedních buněk jsou situované nexy (gap junctions), které nehrají roli v adhezi, ale umožňují předávání informací mezi sousedními buňkami. Prostřednictvím nexů dochází k výměně iontů (především Ca^{2+}), ale i větších molekul (aminokyseliny, adenosintrifosfátu-ATP, adenosindifosfátu-ADP, a adenosinmonofosfátu-AMP).

AT I přítomné při narození jsou vyvinuty zatím z dosud ne zcela známé progenitorové buňky [3]. AT I pokrývají až 95% alveolární plochy při 8-10% celkového počtu alveolárních buněk [4]. Jsou to velmi ploché buňky s tenkými a dlouhými výběžky (až 10-15 μm), které v místě jádra dosahují tloušťky 4-6 μm , v ostatních částech jen kolem 0,2 μm . Apikální povrch je u lidských dospělých AT I široký a dosahuje až 5000 μm^2 . Kolem jádra se nachází několik cisteren granulárního endoplazmatického retikula, malý Golgiho komplex a malé mitochondrie. Alveolokapilární membrána, která je důležitá pro výměnu plynů je tvořena bazální membránou alveolárních kapilár a AT I. Kromě výměny plynů mají AT I význam při regulaci alveolární vodní rovnováhy a stimulaci tvorby surfaktantu na podkladě změny napínání tkáně. AT I se od AT II liší kromě jiného i povrchovým nábojem, enzymatickou aktivitou a membránovými molekulami. Rozdílná je i produkce některých specifických povrchových proteinů, které jsou produkovány zejména při poškození pneumocytů. Podle specifity jednotlivých proteinů pro AT I, AT II nebo jiné buňky je možné je rozdělit do třech skupin. V první skupině jsou proteiny specifické pouze pro AT I (AT I specifické buňky), ve druhé skupině jsou proteiny tvořené AT I a jinými buňkami plic, nikoliv AT II (AT I selektivní buňky), ve třetí skupině jsou proteiny tvořené AT I a AT II, převážně však AT I. (AT I buňky selektivní, asociované) (tab. 1.) [4].

Tab. 1. Přehled specifických povrchových proteinů AT I a AT II buněk.

AT I proteiny	Průkaz metodou	Lokalizace	Přítomnost i v jiných buňkách	Citace
Skupina 1. AT I specifické buňky RTI ₄₀ /TI _α	IEM	Apikální plazmatická membrána	Ne	38
HTI ₅₆	IEM	Apikální plazmatická membrána	Ne	39

Skupina 2 AT I buňky selektivní Caveolin -1/2					
	IEM		Mikrovesikuly	Endoteliální buňky, fibroblasty, buňky hladké svaloviny, bronchiální epiteliální buňky	40
	IF		Bazolaterální membrána		41
					42
	IEM		Apikální plazmatická membrána	Bronchiální epiteliální buňky	
	IEM				
Na ⁺ /KATPáza α_2 izoformy					
Aquaporin 5					
Cytochrome P ₄₅₀ 2B1					
Karbonypeptidáza M	IHC		Cytoplazma	Bronchiální epiteliální buňky	43
			Apikální plazmatická membrána	Alveolární makrofágy	44
Skupina 3 AT I buňky selektivní/asociované					
ICAM-1	IEM		Apikální plazmatická membrána	Alveolární makrofágy, bronchiální epiteliální buňky, endoteliální buňky AT II buňky ?	45
Connexin 43	IF		Buněčné membrána, cytoplazma	AT II buňky	46
P-glykoprotein	IF		Apikální plazmatická membrána	Buňky hladké svaloviny, bronchiální epitel, AT II buňky?	47
RAGE	IEM		Bazální membrána	Endoteliální buňky velkých cív, AT II buňky	48
PA-I	IF		Apikální plazmatická membrána	AT II buňky?	49
P2X4 purinoceptor	IF		Plazmatická membrána	AT II buňky?	49
CDKN2B	IF		Perinukleárně	AT II buňky?	49
ATB ⁰⁺	IF		Apikální	Ciliární buňky,	50

CytochromeP ₄₅₀ 1A1		ISH	membrána	AT II buňky? Bronchiální epitelální buňky, AT II buňky	51
Eotaxin		ISH		Epitel dýchacích cest, makrofágy, lymfocyty, endoteliální buňky	52
GGT		IEM, IF	Apikální membrána	Clara buňky, AT I buňky	53
IGFR-2		IHC	apikální plazmatická membrána		54

RTI40/T1 α je typický protein lokalizovaný v apikální části AT I buněk hlodavců. Mutace genu pro tento protein se projeví u postižených jedinců ihned po narození rozvojem závažné respirační insuficience. Při histologickém vyšetření plic byly patrné úzké a nepravidelné dýchací cesty a abnormální sakuly. Je tedy domněnka, že T1 α protein je důležitý pro správný vývoj distálních dýchacích cest. Lidským homologem uvedeného proteinu jsou proteiny označované hT1 α -2 a gp 36. Jejich funkce v lidských AT I není zatím přesně známa [5-7]. Dobbs a kol. připravili specifické protilátky proti HTI56 proteinu, které byly použity ke kvantifikaci postižení AT I u ARDSy [8]. HTI56 patří rovněž ke specifickým povrchovým proteinům AT I jehož funkce není dosud přesně známa. Rovněž není jasné zda RTI40 a HTI56 jsou homologní. Newman a kol. vyšetřovali HTI56 protein v alveolární tekutině a plazmě ve skupině nemocných s ARDSy a u nemocných s edémem plic kardiální etiologie. Koncentrace HTI56 byla signifikantně zvýšená ve skupině nemocných s ARDSy. Plicní poškození (toxické účinky vdechovaných plynů, zánět, fyzikální stres) vede ke změně specifických proteinů AT I buněk v důsledku jejich změněné exprese nebo regulace. Ultrastrukturální

změny pneumocytů vedou k jejich odloučení do alveolárního prostoru. Na animálním modelu akutního plicního postižení (acute lung injury - ALI) způsobeném infekcí *Pseudomonas aeruginosa* prokázal McElroy a kol. 80-ti násobné zvýšení RTI40/T1 α hodnot v BALu již po 6 hod od vzniku infekce [9]. Podobný efekt popsal stejný autorský kolektiv při inhalaci NO₂, a při hyperoxii [10]. Vliv velikosti dechových objemů (TV) při umělé plicní ventilaci na hodnoty RTI40/T1 α sledovala práce Franka a kol. Na zvířecím modelu (potkan) bylo indukováno plicní postižení instilací HCl do dýchacích cest. Jako marker postižení AT I buněk byl opět sledován RTI40/T1 α protein. Plíce byly ventilovány dvojím režimem. Vysokým TV (12 ml/kg) a fyziologickým dechovým objemem. Autoři prokázali, že snížení TV z 12 na 6 ml/kg vedlo ke snížení produkce proteinu RTI40/T1 α o 46% [11]. Ukazuje se tedy, že by specifické povrchové proteiny AT I mohly být markerem rozsahu postižení AT I [12].

Kaveoly jsou invaginace plazmatické membrány buněk dosahující velikosti 50 - 100 nm. Součástí kaveol jsou integrální proteiny kaveoliny 1-3. Kaveoly mají důležitý význam v endocytóze, v lipidové homeostáze, signální transdukci i tumorigeněze. Transgenní myši, u kterých byl knockautován gen pro tvorbu kaveolinu 1 a 2, se narodily zdravé, avšak ve věku 4-5 měs. se u nich rozvinula plicní patologie, která připomínala rozvoj plicní fibrózy. Histologicky bylo zjištěno zúžení alveolárních stěn, endoteliální hyperproliferace a zvýšení extracelulárních matrixových proteinů [13]. Některé práce předpokládají, že kaveolin 2 je nutný pro mitigaci mechanických sil, které stimulují proliferaci plicních buněk [14].

Aquaporiny (AQP) jsou relativně malé integrované membranózní proteiny, které se uplatňují při transportu vody přes buněčné membrány. Přestup vody přes dvojvrstvou lipidovou hydrofobní buněčnou membránu je značně delikátní záležitostí, přitom přechod vody přes membrány je životně důležitý. Téměř stoleté vědecké úsilí o zjištění

transportních vodních mechanismů bylo završeno objevem Petera Agreho (vodní kanály) a Rodericka McKinnona (struktura draselného kanálu). Oba vědci získali za své objevy v r. 2003 Nobelovu cenu. U savců je známo minimálně 11 typů aquaporinů, které se vyskytují v řadě orgánů a tkání. Čtyři z nich se vyskytují v dýchacích cestách a alveolární části plic. AQP 1 je lokalizován v kapilárním endotelu alveolů a dýchacích cest a v mezoteliálních buňkách viscerální a parietální pleury, AQP 3 v bazolaterálních částech epitelii velkých dýchacích cest, AQP 4 v epitelii všech dýchacích cest a AQP 5 v apikální části plazmatické membrány AT I buňkách a v submukózních glandulárních buňkách. Exprese a funkce některých AQP je regulována růstovými faktory, zánětlivými mediátory, osmotickým stresem a farmaky [15-17]. Význam jednotlivých AQP byl prokázán u transgenních myší [18, 19]. Hlavním AQP v distálních částech plic je AQP 5, který je lokalizován v apikální části plazmatické membrány AT I buněk a který se uplatňuje při osmotickém přesunu tekutiny z plynné části alveolu do interstitia a kapilárního prostoru. U myší s delecí genu pro AQP 5 byla prokázána 10-ti násobná redukce permeability pro vodu a u dvojité knockautovaných myší pro AQP 5 a AQP 1 (lokalizovaný v endoteliích plicního kapilárního řečiště) dokonce 30-ti násobná redukce schopnosti permeability pro vodu. Na druhou stranu u těchto knockautovaných myší nebyla prokázána redukce aktivní absorpce vody z alveolárního kompartmentu nebo dokonce absorpce stimulovaná β -agonisty či růstovými faktory [20].

Pro výměnu plynů přes alveolokapilární membránu je nezbytný předpoklad funkčního alveolu bez přítomnosti tekutiny. Elektronovou mikroskopií byla v apikální části plazmatické membrány AT I buněk prokázána přítomnost α_2 -izoformy Na^+/K^+ - ATPázy, která zajišťuje aktivní transport vody z alveolárního kompartmentu do kapilár [21]. Za určitých patologických stavů, jako např. po prodělané asfyxii dochází k

degradaci α_2 -izoformy Na^+/K^+ -ATPázy, což je jeden z faktorů, který se může podílet na rozvoji plicního edému. Znalost regulace a aktivity α_2 -izoformy Na^+/K^+ -ATPázy může být jedna z cest jak ovlivnit léčbu postižené plíce [18].

U novorozenců s vrozenou brániční kýlou je častým nálezem plicní hypoplázie. Takavas a kol. prokázali v experimentu, kdy podáním nitrofenu navodili u potkanů rozvoj plicní hypoplázie, snížení mRNA AQP 5. Podle autorů může downregulace exprese AQP 5 vést k abnormálnímu metabolismu vody v plicní tkáni a poruše jejího vývoje [22]. K podobným závěrům došla i práce Burgosa a kol. [23].

Dalším sledovaným biomarkerem určující stupeň postižení epitelu v alveolárním kompartmentu je antiinflamatorní CC16 protein produkovaný Clara buňkami dolních dýchacích cest [24]. Kropski a kol. prokázali signifikantně nižší plazmatické hladiny CC16 ve skupině pacientů s ALI/ARDSy ve srovnání se skupinou pacientů s kardiogenním plicním edémem [25].

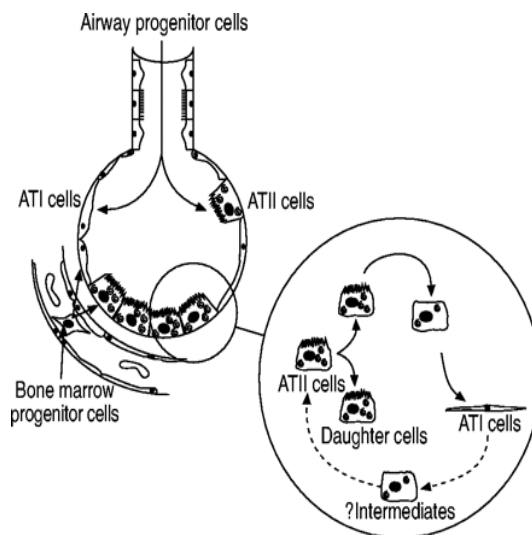
Některé uvedené markery vyskytující se v AT I buňkách je možné již v současné době využít k diagnostice a zároveň i k určení stupně závažnosti postižení plíce. Znalost patofyziologických cest jednotlivých faktorů umožní do určité míry terapeutické ovlivnění a správné nastavení jednotlivých parametrů ventilační podpory. Mohly by přispět při terapeutické rozvaze kdy nahradit nezbytně traumaticky vedenou umělou plicní ventilaci např. některým ze způsobů nekonvenční ventilace nebo mimotělní podpory (ECMO-extrakorporální membránová oxygenace).

3.2 Pneumocyty II. typu – alveolární typ II.

O významu alveolárních buněk II. typu (AT II buňky) referoval již v roce 1954 Macklin. Předpokládal, že tyto buňky jsou zodpovědné za produkci faktoru, který snižuje povrchové napětí alveolu, zvyšuje clearance cizích inhalovaných částic a pomáhá zabránit transudaci tekutiny do alveolárního kompartmentu [26]. V roce 1977 Mason a Williams formulovali na základě v té době známých faktů koncept alveolárních buněk II. typu jako „obránce alveolu“. Jako hlavní funkce byly označeny

- a) produkce faktoru snižující povrchové napětí (syntéza, sekrece a recyklace surfaktantu),
- b) hyperplázie jako reakce na poškození alveolárního epitelu (pneumocyty II. typu jsou progenitorovou buňkou pro pneumocyty I. typu),
- c) významná role v udržování vodní rovnováhy v alveolárním kompartmentu,
- d) aktivaci koagulační kaskády,
- e) imunoregulační funkce a
- f) interakce s rezidentními a mobilními buňkami buď přímým kontaktem nebo zprostředkovaně (obr. č. 6) [27-29].

Obr. č. 6 Schéma vývoje a reparace alveolárního epitelu. Poškozené epitelie jsou nahrazovány proliferací a diferenciací AT II buněk přes tzv. intermediární buňky, které se dále diferencují v AT I buňky. Poškozené buňky mohou být rovněž



nahrazeny buňkami kostní dřeně nebo mohou vzniknout progenitorových buněk dýchacích cest. Role AT I není zcela ještě přesně známa. (Obr. převzat z M.C. McElroy and M. Kasper. The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair. ERJ October 1, 2004 vol. 24 no. 4 664-673.)

AT II buňky jsou buňky polyedrického typu, které měří v průměru 8 - 12 μm . Jsou většinou lokalizované v místech, kde stěna alveolu vytváří záhyb. Jejich laterální stěny jsou často pokryty výběžky AT I buněk. AT II buňky mají charakter sekrečních buněk. Na apikálním pólu jsou vytvořené mikrokly. Buňky obsahují velké jádro, četné mitochondrie, vyvinuté granulární endoplazmatické retikulum a mohutný Golgiho komplex. Typickým nálezem je přítomnost lamelárních tělísek, ve kterých je tvořen a deponován antiatelektatický faktor surfaktant.

Surfaktant je tvořen fosfolipidy (80 - 90%) a proteiny (10%). Proteinová frakce je tvořena z velké části sérovými proteiny a čtyřmi apoproteiny, které jsou podle konsensus konference z roku 1988 označovány jako SP-A, SP-B, SP-C a SP-D. V uvedeném složení je surfaktant tvořen pouze v AT II buňkách. Na vnitřní povrch alveolů se dostává exocytozou, kde vytváří tenkou vrstvu řídké hypofáze bohaté na proteiny krytou monomolekulární linií fosfolipidů. Jeho hlavní funkcí je snižování povrchového napětí alveolu. Ovlivnění povrchového napětí je jedním z faktorů, který se podílí i na udržování vodní rovnováhy v alveolárním kompartmentu [30, 31].

Tvorba a sekrece surfaktantu je řízena signální transdukcí aktivující tři metabolické cesty, které se mezi sebou navzájem ovlivňují. Stimulace β_2 -receptorů, které jsou napojeny na heterotrimerní G-proteiny, vede k aktivaci adenylcyklázy s následnou zvýšenou produkcí cyklického adenosin monofosfátu a proteinkinázy A

[32]. Druhou cestou je přímá, nebo nepřímá aktivace proteinkinázy C. Odpovídající receptory jsou spřažené s Gq-proteinem s následnou aktivací fosfolipázy C. Fosfolipáza C hydrolyzuje fosfatidylinositoldifosfát na inozitoltrifosfát a diacylglycerol, který aktivuje proteinkinázu C [33, 34]. Třetí cesta je charakterizována vzestupem intracelulárního Ca^{2+} (důsledek působení diacylglycerolu) s aktivací Ca-kalmodulin dependentní proteinkinázy. Fosforylace proteinů vlivem působení proteinkinázy A, C a Ca-kalmodulin dependentní proteinkinázy v konečném důsledku vede k sekreci surfaktantu. Sekrece fosfolipidové části surfaktantu a specifických proteinů SP-B a SP-C probíhá v rámci regulované exocytózy, zatímco produkce SP-A a SP-D má hlavně konstitutivní charakter [35, 36]. Pro vlastní sekreci surfaktantu je důležitá vzájemná komunikace mezi alveolárními epitelii. Těsné spojení pneumocytů I. a II. typu prostřednictvím nexů umožňuje transmissi inozitoltrifosfátu a Ca^{2+} do pneumocytů II. typu s následným zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} [37]. Uvedená transmise je spouštěna především rozepjetím alveolu a stimulací AT I buněk (proces mechanotransdukce) nebo parakrinní stimulací purinergních receptorů prostřednictvím ATP. Oscilace intracelulární hladiny Ca^{2+} je jedním z rozhodujících faktorů pro vlastní uvolnění surfaktantu do alveolárního kompartmentu [38, 39]. Surfaktant uvolněný do alveolárního prostoru prodělává transformaci. Materiál z lamelárních tělísek je přeměňován v tubulární myelin (velké agregáty) a vezikulární surfaktantové formy (malé agregáty) [40, 41]. Vzájemný stabilní poměr mezi velkými a malými agregáty jsou předpokladem pro normální funkční integritu alveolárního surfaktantu. Absence tubulárního myelinu společně s deplecí SP-A byla prokázána u nezralých novorozenců se závažným průběhem respiratory distress syndromu [42]. Paradoxně u myši, u kterých byl knokautovaný gen pro SP-A, byl zjištěn i výrazný deficit tubulárního myelinu bez

zásadního dopadu na funkci plic [43, 44]. Zjištěná skutečnost je diskutována. Linie surfaktantu je důležitým rozhraním mezi plynnou a liquidní fází v alveolárním prostoru.

Asi 85% vytvořeného surfaktantu je zpětně vstřebáno a metabolizováno v AT II buňkách [45]. Vstřebávání fosfolipidové frakce je ovlivňováno SP-A, SP-B, SP-C proteiny [46-48]. Úloha SP-D je v tomto směru zatím nejasná. V případě SP-A jde zřejmě o receptorem zprostředkovaný proces [49, 50]. Za degradaci surfaktantu jsou zodpovědné alveolární makrofágy a v minimální míře pneumocyty II. typu. Degradční a metabolické cesty jsou odlišné jak pro fosfolipidy, tak i pro SP-A [51]. Předpokládá se, že porucha degradace surfaktantu by mohla být jednou z příčin alveolární proteinózy [52].

AT II buňky plní úlohu integrační jednotky alveolu. Přestože tvoří až 60% všech alveolárních epitelů, zaujímají pouze 5% celkového alveolárního povrchu. Během kanikulární fáze plicní morfogenézy jsou pneumocyty II. typu svojí bazální částí v úzkém kontaktu s fibroblasty. Během vytváření alveolárních sept se při remodelaci dostávají do většího prostorového kontaktu s endoteliálními buňkami cévních kapilár [53]. Pro normální funkci alveolárního epitelu je nezbytná vzájemná interakce fixních buněk (pneumocyty I. typu, fibroblasty, endoteliální buňky) a mobilních buněk (alveolární makrofágy, leukocyty). Kromě již výše uvedené mechanické stimulace AT I buněk a následným ovlivněním AT II buněk a uvolněním lamelárních tělísek do alveolárního prostoru existují i zpětnovazebná ovlivnění mezi AT II buňkami navzájem. AT II buňky mají membránový receptor pro SP-A, který po jeho obsazení vede ke snížené exocytóze surfaktantu v pokusu in vitro. Avšak při in vivo experimentech nebyla tato autokrinní regulace jednoznačně prokázána. Práce na myších, které byly knockautovány pro tvorbu SP-A, nebyla prokázána porucha sekrece surfaktantu. To

ukazuje na možný alternativní mechanismus kompenzující ztrátu SP-A zpětnovazebné reakce [54].

AT II buňky typu jsou schopny exprimovat velký počet membránových molekul nezbytných pro percepci a jsou schopny zajistit produkci signálů nezbytných pro vzájemnou interakci buňka - buňka (přímou i nepřímou) a buňka - buněčná matrix.

Alveolární septum představuje nejtenčí bariéru mezi krevní plazmou a vdechovaným vzduchem. Je tvořeno alveolárním epitelem, jeho bazální membránou a bazální membránou kapilárního endotelu a endoteliálních buněk. Alveolární septa obsahují volné buňky (lymfocyty, makrofágy, plazmatické buňky, žírné buňky, eosinofily a neutrofilny, intersticiální fibroblasty, a kontraktilní elementy. Intersticiální fibroblasty syntetizují kolagenní a elastická vlákna, proteoglykany a glykosaminoglykany. Přehled, lokalizaci a funkci jednotlivých typů kolagenu ukazuje tab.2.

Tab. č. 2. Přehled, lokalizace a funkce jednotlivých typů kolagenu produkovaných intersticiálními fibroblasty.

Typ kolagenu	Lokalizace	Funkce
Typ I	Alveolární intersticiu, pleura, bazální membrána cév a bronchů	Tenká podpurná vlákna
Typ II	Chrupavky dýchacích cest	Podpurné fibrily
Typ III	Alveolární intersticiu, cévy, bronchy, pleura	Jemné retikulum, podpurná vlákna
Typ IV	Bazální membrána	Podpurná vlákna

Typ V	Bazální membrána	Podpurná vlákna
Elastická vlákna	Alveolární intersticiu, cévní stěna, dýchací cesty, pleura	Elasticita a podpurná vlákna
Proteoglykany	Intersticiální matrix, bazální membrána, chrupavky	Buněčné adheze
Glykosaminoglykany	Intersticiální matrix	Ovlivnění pohybu tekutiny

Důležitou roli v rozvoji plicní fibroproliferace hrají myofibroblasty a fibroblasty. K etiologickým faktorům patří chronické zánětlivé infekční procesy, autoimunní a alergické reakce, chemické a radiační poškození, fyzikální vlivy, toxické látky, kovy, částice, vlákna aj.. Za nadměrnou tvorbu a depozici extracelulární matrix, jejíž nejdůležitější součástí je kolagen jsou zodpovědné především myofibroblasty.

3.3 Myofibroblasty.

Myofibroblasty vznikají jednak z některých rezidentních mesenchymálních buněk, epiteliálních a endoteliálních buněk a z cirkulujících fibroblast-like buněk nazývaných fibrocyty. Myofibroblasty jsou aktivovány různými mechanismy zahrnující parakrinní signály předávané od lymfocytů a makrofágů a autokrinními faktory produkovanými fibroblasty. Důležitými faktory ovlivňující fibroproliferaci patří cytokiny (IL-13, IL-21, TGF-1 β , růstové faktory (PDGF), chemokiny (MCP 1, MIP 1- β) PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), proteiny akutní fáze, kaspázový systém a součásti renin-angiotensin-aldosteronového systému. Možné terapeutické využití je předmětem některých studií [55, 56].

3.5 Plicní makrofágy.

Plicní makrofágy a polymorfonukleáry mají z volných buněk největší význam v patofyziologii plicního biotraumatu. Významnou roli hrají i endoteliální buňky.

Alveolární makrofágy jsou vysoce specializované mononukleární fagocytární buňky lokalizované v alveolárním prostoru. Jsou to první imunokompetentní buňky, které přicházejí do styku s inhalovaným antigenem a jsou prvními buňkami, které hrají důležitou roli v imunitní odpovědi plic [57].

Alveolární makrofágy jsou významným produkčním zdrojem cytokinů, chemokinů eikosanoidů, hrají důležitou roli v produkci volných kyslíkových a nitrátových radikálů, aktivují adhezivní molekuly [58]. Spouštěcím mechanismem jejich aktivace je přítomnost infekčního agens, vliv chemokinů a cytokinů a fyzikální napínací stres. Jednotlivé vyvolávající faktory vedou různými patofyziologickými pochody ke stejnému efektu a to je exprese příslušného genu DNA pro tvorbu odpovídajícího cytokinu nebo chemokinu. Lentsch a kol. prokázali v plicích potkanů, v kterých byl snížen počet alveolárních makrofágů a v kterých byl navozen zánětlivý proces pomocí depozit IgG, sníženou produkci cytokinů (TNF- α , IL-1 β), chemokinů (MIP-2 – makrofágový inflamatorní protein-2) a zároveň i sníženou expresi adhezivních molekul ICAM-1 [59, 60]. Pugin a kol. poukázali na modelu plic na vliv alveolárních makrofágů a jejich zvýšenou produkci IL-8 jako odpověď na mechanický stres. Zároveň upozornili na úlohu alveolárních makrofágů ve vztahu k remodelingu plicní tkáně prostřednictvím zvýšené de-novo syntézy matrixové metaloproteinázy-9 a IV. typu kolagenu opět v důsledku zvýšeného mechanického stresu [61].

Kontraregulačně při tvorbě uvedených cytokinů a chemokinů se uplatňuje skupina nukleárních hormonálních receptorů PPARs, které fungují jako transkripční faktory regulující expresi genů. PPARs jsou lokalizované predominantně v tukové tkáni, kde mají významnou regulační funkci v glukózovém metabolismu a při adipogenézi. Jsou známy 3 hlavní subtypy: PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ . Jejich stimulaci ovlivňuje kromě jiného IL-4. Antiinflamatorní aktivitu PPAR γ , resp. PPAR γ 2 v humánních alveolárních makrofázích popsal Asada a kol. [62]. Izolované humánní alveolární makrofágy byly stimulovány bakteriálním LPS. Po podání ligandů PPAR γ (15-deoxy- δ 12,14prostaglandinu J2 a troglitazone) došlo k významnému snížení produkce TNF- α . Navíc byl prokázán vzestup exprese receptoru CD 36, receptoru, který reguluje fagocytózu apoptotických neutrofilů. V práci bylo zvažováno i možné potenciální terapeutické použití uvedených ligandů.

3.6 Polymorfonukleární leukocyty.

Polymorfonukleární leukocyty (PMN) jsou potentní imunitní efektorové buňky, které produkují kyslíkové radikály, složky komplementu, metabolity kyseliny arachidonové, proteolytické enzymy a četné cytokiny, které se mohou podílet na plicním poškození. Do plic jsou atrahovány v přítomnosti IL-8, MIP 2 (zdrojem jsou alveolární makrofágy), a CXC chemokinů MIP-1 α a MIP-1 β . Na povrchu PMN jsou exprimovány receptory CXCR1 a CXCR2, které jsou většinou propojeny s G-proteinem. Spouštěcím mechanismem uvedené kaskády je nejen přítomnost infekce, ale i mechanický stres [63]. Významem CXC chemokinů (MIP-1 α a MIP-1 β) v rozvoji

VILI se zabývala práce Balperia a kol.. V animálním experimentu (myši) prokázal ve skupině zvířat ventilovaných vysokým tlakem při nízkém PEEPu významně zvýšené hodnoty CXC1 a CXC2 chemokinů ve srovnání se skupinou ventilovanou nízkým tlakem a nastavenou hodnotou PEEPu. V souvislosti s tím byla ve skupině ventilovaných vysokým tlakem prokázána i zvýšená sekvestrace PMN a výrazné poškození plicní tkáně (výrazný plicní edém, leukocytární infiltrace, alveolární hemoragie a ztenčení až ruptury alveolárních membrán). Zároveň prokázali, že podání inhibitorů CXC1 a CXC2 vedlo ke snížené sekvestraci PMN a následnému menšímu poškození plic [64-66]. Polymorfonukleáry hrají rovněž výraznou roli v rozvoji ALI i ARDSy [67].

Endoteliální buňky vytvářejí jednovrstevnou souvislou výstelku plicních cév. Je poměrně hodně známo o vlivu třecích sil (shear stress) na endoteliální cévní výstelku, avšak dosud je málo informací o vlivu mechanického stresu (střížné síly) na plicní endoteliální buňky. Participace endotelu na rozvoji zánětlivého procesu v plicích předpokládá aktivaci endotelu. Plicní cévní endotel je aktivován LPS, IL-1 β a TNF- α . Ten pak ovlivňuje produkci IL-8, epiteliální neutrofilů aktivující peptid (ENA 78) a mediátory způsobující sekvestraci a degranulaci PMN [68].

4. Vývoj pojmu barotrauma, volumotrauma a biotrauma. Patofyziologické poznámky.

Jak již bylo uvedeno, UPV se stala nepostradatelnou základní metodou v léčbě dechové nedostatečnosti prováděnou na jednotkách intenzivní péče. Její širší zavedení mělo za následek objevení se akutních i chronických komplikací. Jednou z prvních

prací, která prokázala vliv UPV vedenou vysokými inspiračními tlaky byla práce Webb a Thierneho [69, 70]. Původním cílem práce bylo zjištění vlivu různých modalit UPV na surfaktant. V experimentální práci byli potkani ventilováni inspiračními tlaky 14, 30 a 45 cmH₂O. Ve skupině ventilované inspiračními tlaky 14 cmH₂O nebyly zjištěné žádné patologické změny na plicích. Ve skupině ventilované inspiračními tlaky 45 cmH₂O bez zařazeného PEEPu došlo k překvapivě rychlým patologickým změnám. Během několika minut nastalo prudké zhoršení stavu zvířat, jehož podkladem byl rozvoj těžkého edému plic. Histologicky byly prokázány disrupce a edematózní prosáknutí interaveolárních sept včetně zánětlivé celulizace. Alveolární prostor byl vyplněn edematózní tekutinou. Ve skupině zvířat, kde byly ponechány stejné inspirační tlaky a nastaven PEEP na hodnoty 10 cmH₂O došlo rovněž k rozvoji popsaných patologických změn, avšak s výrazně pomalejším vývojem. Zjištěné nálezy byly velmi překvapivé, protože byly v rozporu s klinickými zkušenostmi u pacientů léčených UPV při ARDSy u nichž bylo nutné použít vysokých inspiračních tlaků. Příčiny uvedených nálezů nebyly zcela jasné. Autoři zvažovali druhové rozdíly mezi plicemi potkana a člověka. Příčinou rozvoje rychlého poškození mohla být i vysoká poddajnost hrudníku potkanů umožňující veliké objemové změny plic. Jako další příčina byla zvažována i vyvolaná dysfunkce surfaktantu. Uvedená práce se stala klíčovou studií mnohonásobně citovanou v pracech zabývajících se vlivem UPV na plicní tkáň.

Ke stejným závěrům došel Dreyfuss a kol. v podobném animálním modelu. 20 min trvající UPV s vysokými inspiračními tlaky bez použití PEEPu měla za následek přesun tekutiny bohaté na albumin do alveolárního kompartmentu, byly prokazovány známky mikrovaskulárního poškození, odloučení alveolárních epitelů od bazální membrány a tvorba hyalinních membrán. V této práci bylo upozorněno, že nikoliv

vysoký tlak, ale nadměrná distenze plicní tkáně vede k jejímu poškození. Na základě uvedených prací se začal více používat pojem volumotrauma [71-73].

V současné době je známo, že v etiopatogenézi plicního postižení hraje důležitou roli rozvoj zánětu s produkcí a uvolněním prozánětlivých mediátorů. Stav je označován jako plicní biotrauma [74]. Spouštěcím momentem může být hypoxie, hyperoxie, ischemicko-reperfúzní změny ale i napínací síly, které vznikají během umělé plicní ventilace [75]. Napínací síly (střížné síly) působí prostřednictvím mechanotransdukce aktivaci zánětlivých buněk a následných kaskádových reakcí [76].

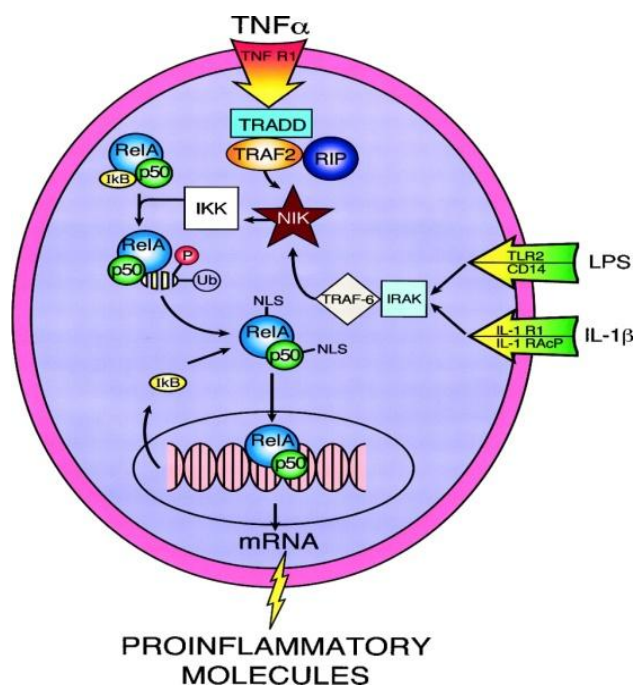
4.1 Vznik zánětlivé odpovědi na umělou plicní ventilaci.

Fyzikální síly (střížné síly) vznikající v rámci mechanické ventilace jsou důležitým spouštěcím mechanismem vedoucím k rozvoji zánětu v plicní tkáni. V konečné fázi mohou způsobit disrupci tkání a buněčných membrán. V důsledku toho dochází ke zvýšené produkci a uvolnění nízkomolekulárních nebo středněmolekulárních solubilních proteinů - cytokinů a chemokinů, které přenášejí signály mezi buňkami účastnícími se zánětlivé odpovědi [66, 77]. Uvolněné cytokiny a chemokiny přecházejí v rámci procesu dekompartmentalizace mimo plicní tkáň a podílejí se na rozvoji multiorgánové dysfunkce [78]. V regulaci jejich produkce má rozhodující roli cytoplazmatický transkripční protein NF- κ B, který je aktivován dvojí cestou. První cesta je spuštěna navázáním TNF- α na TNF membránový receptor a druhá stimulací CD14 nebo Toll-like receptoru prostřednictvím bakteriálního lipopolysacharidu nebo IL-1 β . Dojde ke spuštění kaskádové reakce, která umožní vazbu NF- κ B na DNA promotorovou oblast cílových genů. NF- κ B je heterodimer složený ze dvou Rel

proteinů p50 (označovaný NF- κ B1) a RelA (označovaný p65). RelA subjednotka obsahuje transkripční doménu, která aktivuje přímou interakcí s bazálním transkripčním aparátem transkripci mRNA pro různé proinflamatorní mediátory, adhezivní molekuly, některé enzymy (inducibilní nitric oxid syntáza, cyklooxygenáza-2) a proteiny akutní fáze zánětu (obr. č. 7) [79]. Tímto aktivačním mechanismem jsou vybaveny bronchiální, bronchiolární a alveolární buňky, ale zároveň i alveolární makrofágy a neutrofily [80, 81].

Obr. č. 7. Schéma aktivace NF- κ B. TNF- α se váže na TNF receptor (TNFR1) a dochází k vytvoření signálního komplexu TNFR1 associated death domain protein (TRADD), receptor-interacting protein (RIP) a TNF receptor associated factor-2 (TRAF-2). Tento signální komplex

aktivuje NF- κ B indukující kinázu (NIK), která způsobuje fosforylaci I κ B. V důsledku aktivace dalších metabolických cest dochází k translokaci NF- κ B do jádra. IL-1 β se váže na IL-1receptor (IL-1R1) a IL-1receptorový akcesorní protein (IL-1RAcP), které facilitují interakci mezi IL-1receptor asociované kinázy (IRAK) a TNFreceptor asociovaného faktoru-6 (TRAF-6). Interakce mezi IRAK a TRAF-6 může být rovněž trigována endotoxinem (lipopolysacharid-LPS)). LPS má vysokou vazebnou afinitu k CD 14 receptoru a toll-like receptoru 2 (TLR2). Vytvoří se signální komplex, který aktivuje NIK a IKK s následnou aktivací NF- κ B. Aktivace NF-



aktivace NF- κ B indukující kinázu (NIK), která způsobuje fosforylaci I κ B. V důsledku aktivace dalších metabolických cest dochází k translokaci NF- κ B do jádra. IL-1 β se váže na IL-1receptor (IL-1R1) a IL-1receptorový akcesorní protein (IL-1RAcP), které facilitují interakci mezi IL-1receptor asociované kinázy (IRAK) a TNFreceptor asociovaného faktoru-6 (TRAF-6). Interakce mezi IRAK a TRAF-6 může být rovněž trigována endotoxinem (lipopolysacharid-LPS)). LPS má vysokou vazebnou afinitu k CD 14 receptoru a toll-like receptoru 2 (TLR2). Vytvoří se signální komplex, který aktivuje NIK a IKK s následnou aktivací NF- κ B. Aktivace NF-

κ B způsobuje expresi mRNA pro různé prozánětlivé mediátory. Převzato z práce autorů Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS: The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. Chest. 2000 May; 117(5):1482-7.

Za normálních okolností je udržována rovnováha mezi produkcí proinflamatorních a antiinflamatorních cytokinů. Avšak již po krátké době stimulace, v tomto případě umělé plicní ventilace, dojde k produkci prozánětlivých cytokinů, které ovlivňují atrakci a aktivaci neutrofilních leukocytů a dalších imunitních buněk [82]. Význam uvedených buněk v rozvoji zánětu způsobeném umělou plicní ventilací prokázala práce, kde u zvířat s navozenou deplecí polymorfonukleárů byl prokázán signifikantně snížený rozsah plicního postižení [83]. Vliv některých proinflamatorních cytokinů (IL-8 a IL-2, GM-CSF, Fas-ligandy) na průběh apoptózy granulocytů ukázala studie provedená u dospělých pacientů s ARDSy. Normální polymorfonukleáry inkubované v tekutině získané z bronchoalveolární laváže nemocných s ARDSy vykazovaly opožděný nástup apoptózy ve srovnání s polymorfonukleáry inkubovanými v tekutině z BALu zdravých jedinců. Autoři došli k závěru, že to byl důsledek přítomnosti uvedených cytokinů, které byly prokázány ve vyšších hladinách u zemřelých pacientů s ARDSy ve srovnání s těmi, kteří přežili [84]. Opožděná apoptóza polymorfonukleárů byla prokázána u novorozenců s rozvinutým chronickým plicním postižením [85, 86].

Cytokiny mají vliv na rozvoj dysfunkce surfaktantu. TNF- α a IL-1 β působí přímo na některé jeho složky a nepřímo působí tím, že zvyšují propustnost alveolokapilární membrány s následným hromaděním tekutiny bohaté na proteiny v alveolárním kompartmentu. Alveolární proteinový leak negativně ovlivňuje funkci, produkci a vstřebávání surfaktantu [87].

4.2 Vliv mechanotransdukce na tvorbu cytokinů.

Mechanotransdukce je další důležitý mechanismus ovlivňující rozvoj místní zánětlivé reakce. Napětíové změny vyvolané mechanickou stimulací ovlivňují mechanosenzitivní struktury - transmembránové receptory, ke kterým patří integriny, natažením aktivované iontové kanály a samotný buněčný cytoskeleton (obr. č. 8).

Obr. č. 8. Schéma mechanotransdukce ve vztahu k buněčné proliferaci.

Napínací síly indukují Ca^{2+} buněčný influx a aktivují protein tyrosin kinázu (PTK), která je zodpovědná za spuštění následující kaskádové reakce. PTK aktivuje fosfolipázu C- γ (PLC- γ), která hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5-difosfát (PIP₂) za vzniku inozitol 1,4,5

trifosfátu (IP₃) a diacylglycerolu (DAG).

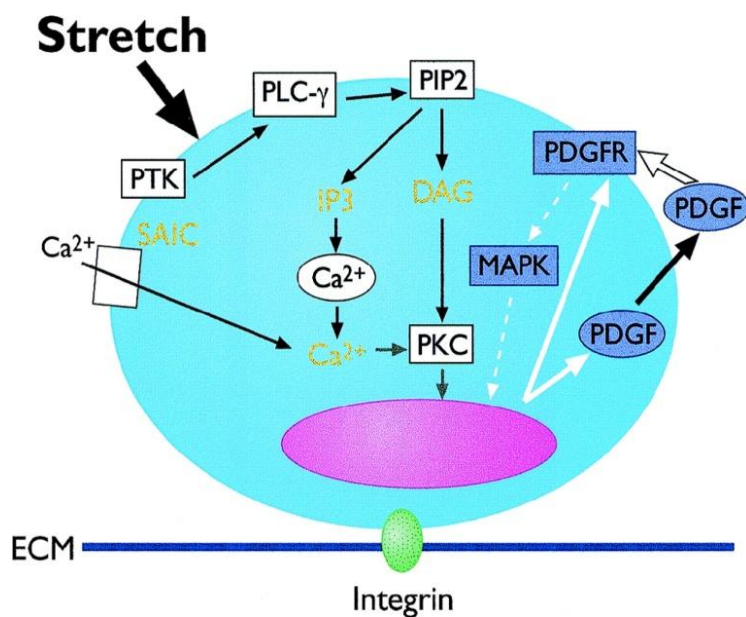
DAG v přítomnosti Ca^{2+} aktivuje proteinkinázu

(PKC), která přímo ovlivňuje kromě jiného

expresi genů pro tvorbu platelet-derived growth

factor (PDGF)-B a PDGF – β receptoru. Ty mají vliv na aktivaci mitogen-aktivované kinázy (MAPK). ECM_ extracelulární matrix, SAIC-natažením aktivovaný iontový

kanál. Převzato: Liu M, Tanswell AK, Post M. Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. Am J Physiol_ 1999 Oct;277(4 Pt 1): L667-83.



Integriny patří do rodiny transmembránových receptorů, které vytvářejí shluky adhezních plaků (obr. č. 9). Jejich hlavním úkolem je ukotvení buněk k bazální membráně a k extracelulární matrix [88]. Cytoplazmatická část integrinů je v těsném kontaktu s proteiny jako je vinkulin, paxilin, talin, Src kináza a fokální adhezní kináza. Uvedené proteiny zajišťují spojení cytoplazmatických mikrofilament a mikrotubulů k plazmatické membráně [88].

Obr. č. 9. Znázornění mechanosenzorů v cytoplazmatické membráně.

Natažením aktivovaný iontový kanál, receptory pro růstové faktory, extracelulární matrix-integriny-

cytoskeletální komplex patří mezi mechanosenzory

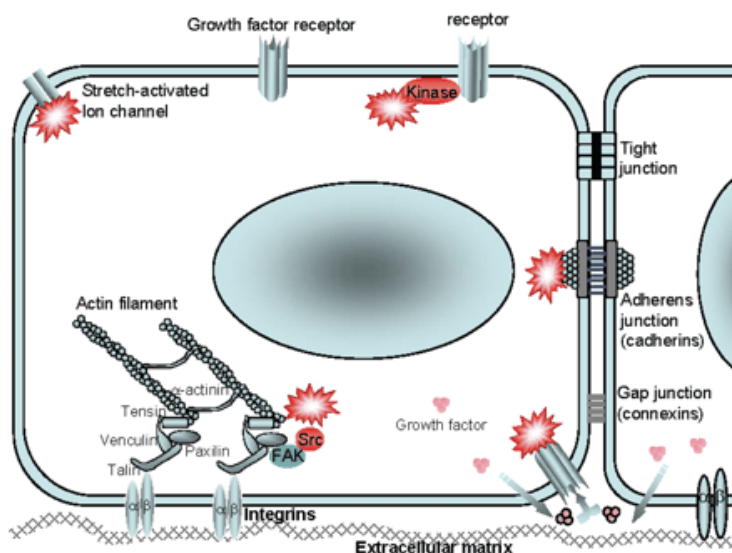
cytoplazmatické membrány.

Převzato: Han B, Lodyga

M, Liu M. Ventilator-

induced lung injury: role of

protein-protein interaction



in mechanosensation. Proc Am Thorac Soc. 2005;2(3):181-7.

Mechanické signály způsobují konformační změny integrinů, které vedou k aktivaci signální kaskádové reakce mitogen-aktivované kinázy (MAPK) a pravděpodobně i cestu aktivace NF-κB [89, 90]. Prostřednictvím c-fos a proteinů p50/p65 se váže na promotorovu oblast příslušného genu s následnou produkcí mRNA zodpovědnou za tvorbu IL-8 [91].

Buněčný cytoskeleton hraje důležitou roli v procesu mechanotransdukce. Mechanické změny způsobují deformaci aktinových filament a mikrotubulární sítě. Jejich prostřednictvím dochází k aktivaci signální cesty podobné, jak je uvedeno v předchozím textu [91].

Mechanicky aktivované iontové kanály rovněž participují v procesu mechanotransdukce. Napnutí buňky vede k defleksi extracelulárního vazebného proteinu navázaného na iontový kanál. Jeho stimulace vede k otevření kanálu a následnému intracelulárnímu iontovému influxu, který spustí signální kaskádovou reakci [92].

MAPK signální kaskáda je nejdůležitější cesta, která je aktivována výše uvedenými mechanosenzitivními strukturami. MAPK je aktivována fosforylací v důsledku působení cyklického adenosin monofosfátu, cyklického guanosin monofosfátu a fosfatidylinositol-3-kinázy. Ty aktivují protein kinázu A, která je zodpovědná za fosforylaci MAPK [91]. Substrátem pro aktivovanou MAPK jsou transkripční faktory, které se vážou na příslušnou promotorovou oblast DNA a modulují genovou transkripci pro jednotlivé cytokiny. MAPK tak zastává důležitou cytoplazmatickou funkci v regulaci mRNA cytokinů [93] [94].

Význam postavení NF- κ B v patogenéze plicního biotraumatu prokázala práce Chiang a kol.. Po podání protilátek proti NF- κ B byl u potkanů při traumaticky vedené ventilaci s TV 15ml/kg prokázán menší rozsah plicního poškození než u zvířat, kterým protilátky podány nebyly. Teoreticky bylo zvažováno i jejich terapeutické použití [95].

5. Cíl a hypotéza práce.

Traumaticky prováděná umělá plicní ventilace vede k rozvoji plicního biotraumatu. Rychlost nástupu biotraumatických změn je popisována u malých zvířat. Na modelu větších zvířat jsou zatím publikovány v tomto směru jen ojedinělé práce.

V předložené práci byl experiment proveden na modelu většího zvířete – prasete bílého. Byly sledovány změny některých plicních funkcí a oběhové změny u spontánně dýchajících, u zvířat ventilovaných fyziologickými dechovými objemy a ve skupině ventilovaných vysokými dechovými objemy (traumaticky prováděná umělá plicní ventilace). K posouzení rozvoje zánětlivých změn v plicní tkáni bylo zvoleno vyšetření prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-8), chemokinů MIP1- β , proteinu inducibilní nitric oxid syntázy (iNOS) a nitritu/nitrátů, které vznikají v důsledku její aktivace. Na začátku experimentu byly stanoveny následující 3 hypotézy:

Hypotéza č.1.: Vysoké dechové objemy vedou během krátké doby k rozvoji lokální zánětlivé odpovědi v plicní tkáni. Jejím výrazem je produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů, které lze prokázat v bronchoalveolární laváži. V práci byl stanoven předpoklad objevení se zánětlivých cytokinů a chemokinů v BALu již po první hodině traumaticky prováděné umělé plicní ventilace.

Hypotéza č. 2: Byl předpoklad, že produkce zánětlivých cytokinů a chemokinů u traumaticky prováděné ventilace bude trvale zvýšená po dobu trvání ventilace vysokými dechovými objemy.

Hypotéza č. 3.: Traumaticky prováděná umělá plicní ventilace vede ke zhoršení parametrů plicních funkcí a má vliv i na oběhové parametry. Rychlost nástupu změn u animálního modelu, jaký byl použit v tomto experimentu, není zatím přesně znám. Byl předpoklad, že změny nastanou v druhé polovině experimentu.

6. Metodika.

6.1 Experimentální zvířata.

Do experimentu bylo zařazeno 23 zdravých selat prasete domácího ve stáří 6-8 týdnů s hmotností v rozsahu 22 – 30kg. Selata prasete domácího mají s lidmi srovnatelnou anatomii i funkční vlastnosti respiračního a kardiovaskulárního systému, proto byla pro studii vybrána. Pro experiment byla vybrána klinicky zdravá zvířata z kontrolovaného chovu. Zvířata byla randomizována a rozdělena do 3 skupin. Skupinu I tvořilo 6 zvířat, která spontánně dýchala. Z důvodu nutnosti provádět bronchoalveolární laváž byla všem na začátku experimentu provedena v celkové anestézii tracheostomie. Do skupiny II bylo zařazeno 8 zvířat. Byla intubována a ventilována dechovým objemem 7 ml/kg, PEEP = 7 cmH₂O, FiO₂ = 0,21, DF = 20/min. 9 zvířat bylo ve skupině III, u kterých byla umělá plicní ventilace vedena traumaticky. TV byl nastaven na 15 ml/kg, PEEP = 0 cmH₂O, FiO₂ = 0,21, DF = 20/min. K umělé plicní ventilaci byl použit ventilátor Siemens Elema 900C (Siemens, Švédsko, Solna), ventilační režim „Volum control“. Hodnoty dynamické plicní poddajnosti byly měřeny přídatným modulem Siemens jako součástí uvedeného ventilátoru. Zvířata byla intubována po předchozí analgosedaci Azaperonem, Ketaminem a Thiopentalem. Uvedené preparáty byly použity i ke kontinuální analgosedaci. Vstup do cévního řečiště byl zajištěn zprvu kanylací periferní žíly a dále navazovalo zavedení centrálního žilního katétru cestou krční žíly. Centrální žilní katétr byl využit jednak pro podávání infúzních

roztoků a jednak pro měření centrálního žilního tlaku (CVP). Za účelem měření invazivního arteriálního krevního tlaku byla kanylována hlavní stehenní tepna. Ke sledování životních funkcí srdeční frekvence (HR), dechové frekvence (RR), arteriálního krevního tlaku (ABP), centrálního žilního tlaku (CVP), SpO₂ (pulzní oxymetrie) byl použit monitor Nihon Cohden. Experiment trval 3 hod. a po celou tuto dobu byla zvířata v hluboké analgosedaci. Po 3 hodinách byl experiment ukončen podáním 10% KCl cestou CŽK do pravé síně. Po smrti byly odebrány histologické vzorky plicní tkáně vždy ze stejné lokality. Vzorky byly až do zpracování uchovány v roztoku 10% formolu. S uhynulými zvířaty bylo zacházeno podle zákonů České republiky.

6.2 Bronchoalveolární laváž a zpracování získaného materiálu.

K bronchoalveolární laváži (BAL) byl použit fyziologický roztok v objemu 50 ml zahřátý na 37°C. Bronchoalveolární tekutina byla odsávána vždy jednorázovým sterilním setem v minimálním množství 15 ml. Získaná tekutina byla filtrována přes sterilní filtr za účelem odstranění hlenu a následně byla centrifugována při 1000 otáčkách/min. po dobu 10 min.

Získaný supernatant byl bezprostředně zmrazen při $T = -70^{\circ}\text{C}$ k dalšímu vyšetření TNF- α , IL-8, nitritů a nitrátů. Získané separované buňky byly uloženy do DMEM media s příměsí 1% antibiotického roztoku (Sigma) a 10% fetálního bovinního séra. Buňky byly inkubovány při 37°C v 5% CO₂ humidifikované atmosféře po dobu 2 - 3 hodin. Neadherované buňky byly po této době měkce odstraněny a adherující buňky

byly kultivovány v 25cm² baňce po dobu 18 - 24 hodin. Na konci kultivace byl supernatant odstraněn a okamžitě zmrazen při T = -70°C. Kultivované buňky byly použity k vyšetření inducibilní nitric oxid syntázy (iNOS) a makrofágového inflamatorního proteinu 1-β (MIP-1β) pomocí western blot analýzy.

6.3 Molekulárně biologické a biochemické metody.

K detekci iNOS byly použity králičí polyklonální protilátky proti myší iNOS (Alexis), a pro průkaz MIP-1β králičí polyklonální antihumánní protilátky proti MIP-1β (Alexis). Průkaz cytokinů v BALu byl prováděn v supernatantu ELISA metodou použitím prasečího ELISA kitu (BioSource Int., Camarillo, CA, USA), kdy jejich absorbance byla detekována při 450nm. Vyšetření nitritů bylo prováděno pomocí nitrate/nitrit kolorimetrického detekčního kitu (Cayman, Ca, USA). Jejich absorbance byla zjišťována v rozsahu vlnové délky 400 – 600 nm na Xflourosafire II verzi 4.62 n.

Vzorky plicní tkáně byly odebrány na závěr experimentu v celkové anestezii po předchozí thorakotomii. Místem odběru byly bazální a dorzobazální části plic. Vzorky byly fixovány v 10% roztoku formolu a následně histologicky zpracovány a vyšetřeny optickou mikroskopií.

6.4 Statistické zpracování.

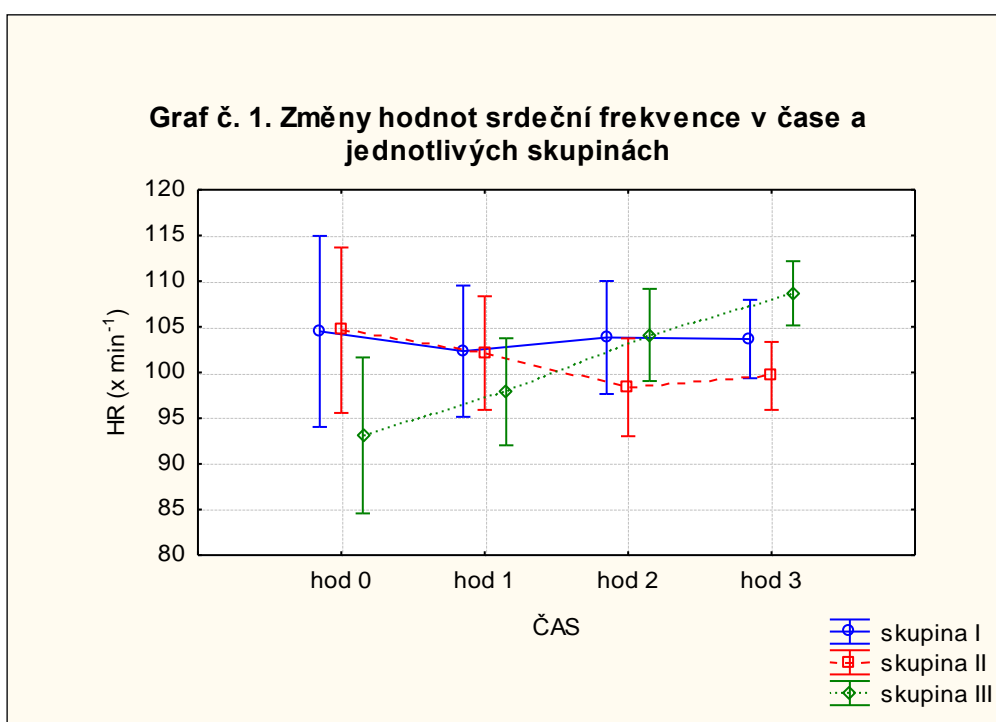
Pro základní analýzu dat byly použity standardní statistické postupy (medián, test normality, ANOVA test a Fischerův test). Statistická analýza byla rozhodována na hladině významnosti 5% a intervalu spolehlivosti 0,95.

7. Výsledky.

7.1 Sledování srdeční frekvence (HR-heart rate).

Ve skupině I nedošlo ke statisticky významným změnám v srdeční frekvenci během celého experimentu. Ve skupině II byl zaznamenán nevýznamný pokles v 1. a 2. hodině ($p = 0,08$ resp $p = 0,16$) a mírná elevace, avšak nevýznamná ($p = 0,72$) ve 3. hod. Ve skupině III byly výchozí hodnoty srdeční frekvence významně nižší ve srovnání se skupinou I i se skupinou II ($p = 0,01$ resp $< 0,001$). V dalším průběhu HR plynule stoupala. Ve 3. hodině experimentu byly hodnoty HR významně zvýšené ve srovnání s výchozí hodnotou ($p < 0,001$) a byly významně vyšší než ve skupině II ($p = 0,03$). Nebyly zjištěné významné rozdíly ve srovnání se skupinou I ($p = 0,27$) (Graf č. 1).

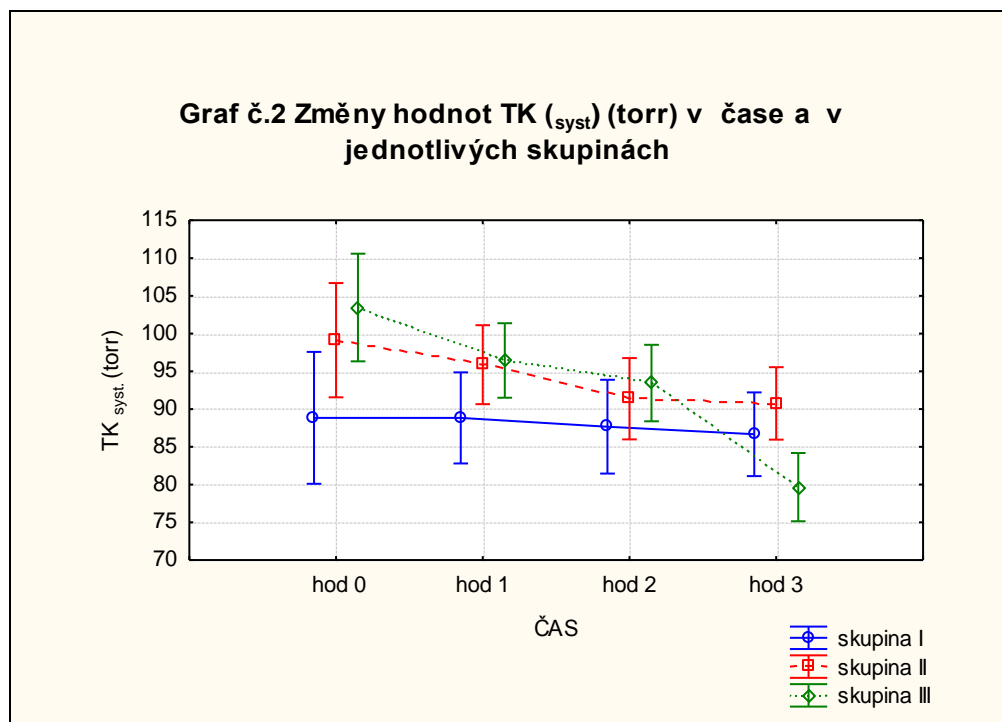
Graf č. 1. Změny hodnot srdeční frekvence v čase a v jednotlivých skupinách.



7.2 Monitorování hodnot krevního tlaku.

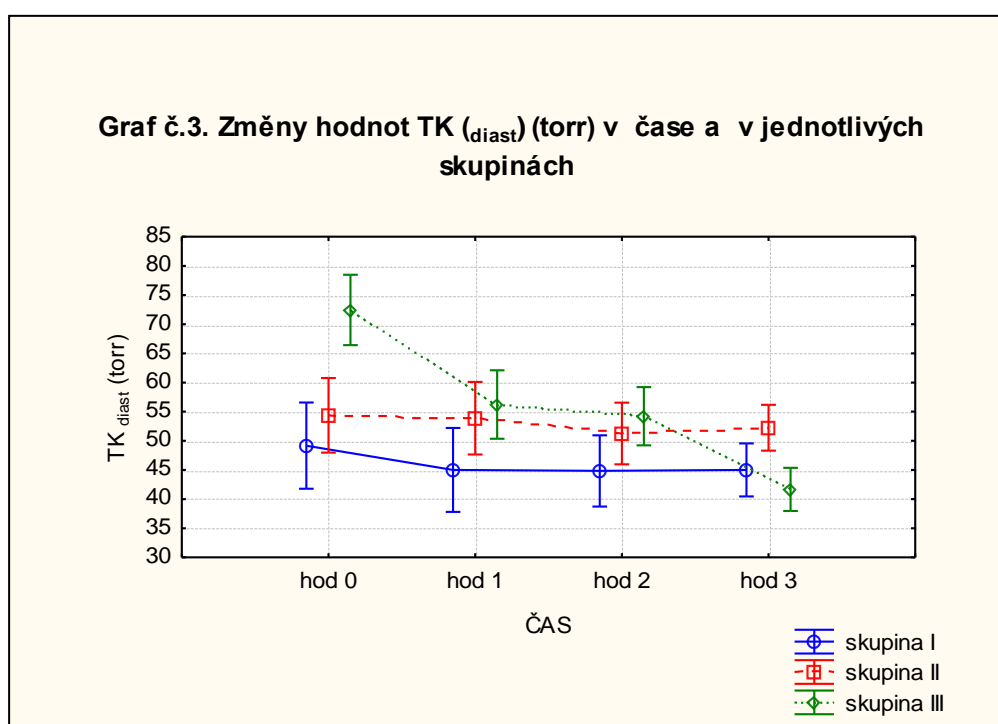
Výchozí hodnoty TK_{syst.} ve skupině II a III byly významně vyšší ve srovnání se skupinou I ($p = 0,02$, resp. $p = 0,03$), mezi skupinou II a III rozdíly zjištěny nebyly ($p = 0,26$). Změny hodnot TK_{syst.} ve skupině I po celou dobu experimentu nebyly významné. Ve skupině II byly zjištěny významné poklesy při srovnání 2. a 3. hodiny experimentu s výchozí hodnotou ($p = 0,005$, resp. $p < 0,001$). Ve skupině III byly zaznamenány významné poklesy v každé hodině pokusu ve srovnání s výchozí hodnotou ($p < 0,001$). Při vzájemném srovnání mezi jednotlivými skupinami byl významný rozdíl mezi skupinou II a III ve 3. hod experimentu ($p = 0,006$). Mezi skupinou III a I ve 3 hodině rozdíl zjištěn nebyl ($p = 0,1$) (Graf č. 2).

Graf č. 2. Změny hodnot TK_{syst.} v čase a v jednotlivých skupinách.



Výchozí hodnota TK_{diast.} byla ve skupině III významně vyšší ve srovnání s ostatními skupinami ($p < 0,001$). Ve skupině I a II nebyly během celého průběhu významné rozdíly ve srovnání s počínající hodnotou TK_{diast.} Ve skupině III docházelo v každé hodině k významný poklesům ve srovnání s výchozí hodnotou. (srovnání 1.,2.,3.hod s výchozí hodnotou: $p < 0,001$ resp. $< 0,001$ resp. $< 0,001$) (Graf č. 3).

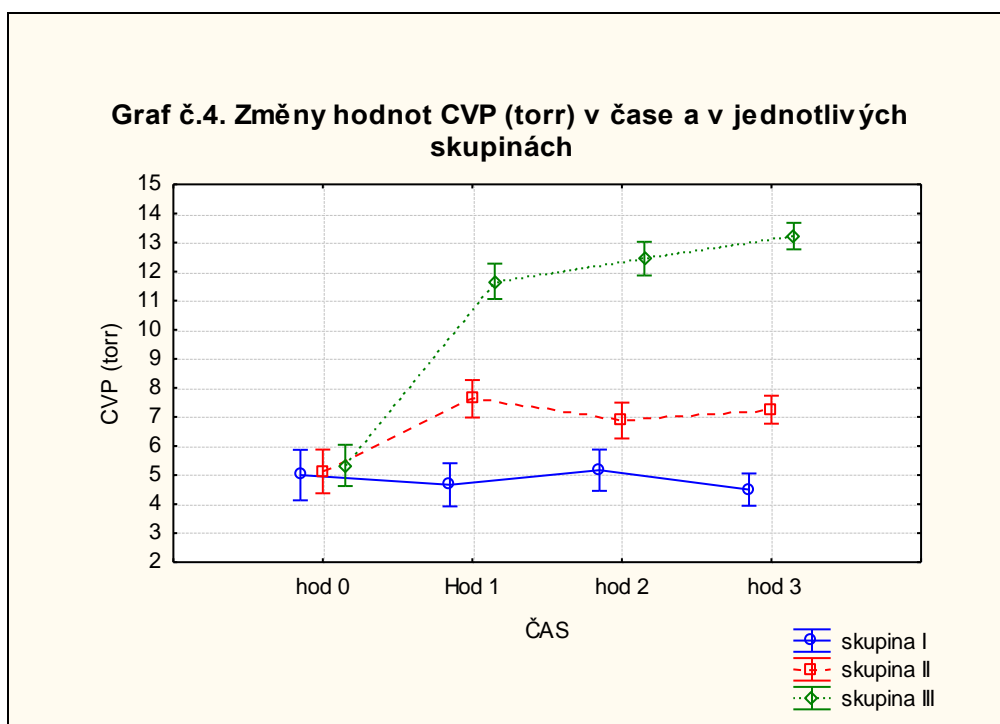
Graf č.3. Změny hodnot TK_{diast.} v čase a v jednotlivých skupinách.



Centrální žilní tlak (CVP). Na počátku studie nebyly významné rozdíly v hodnotách CVP v jednotlivých skupinách. Hodnoty CVP nevykazovaly ve skupině I statisticky významné rozdíly. Zahájení umělé plicní ventilace vedlo ve skupině II k významnému zvýšení CVP v 1. hod. ($p < 0,001$), v dalších intervalech nebyly zjištěny významné rozdíly ve vztahu k výchozí hodnotě CVP ($p = 0,25$). Ve skupině III došlo

v první hodině k významnému vzestupu CVP ($p < 0,001$) a v následujících hodinách byl další každý vzestup signifikantně významný ($p < 0,001$ resp $p = 0,01$) (Graf č. 4).

Graf č.4. Změny hodnot CVP v čase a v jednotlivých skupinách.

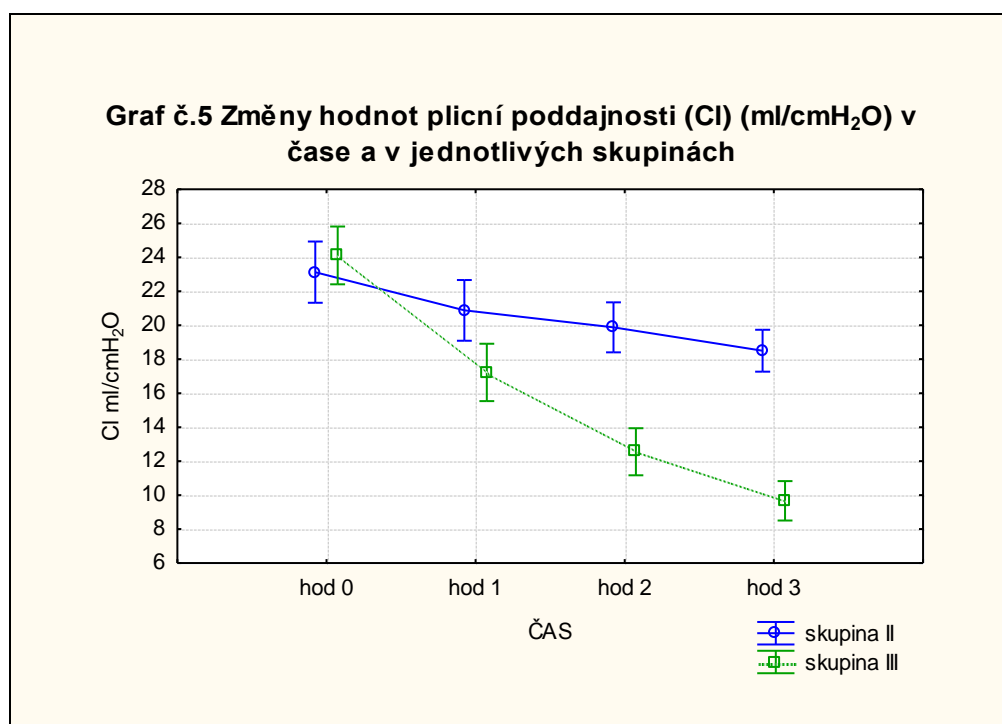


7.3 Dynamika změn plicní poddajnosti.

Plicní poddajnost byla měřena pouze u zvířat, u kterých byla prováděna umělá plicní ventilace (skupina II a skupina III). Počáteční hodnoty Cl byly v obou skupinách srovnatelné, nebyly zjištěné statisticky významné rozdíly ($p = 0,34$). Ve skupině II došlo k významnému poklesu v 1. a ve 3. hod. ve srovnání s výchozí hodnotou ($p < 0,001$). Ve skupině III byly při srovnání s výchozí hodnotou významné poklesy v každé hodině

experimentu ($p < 0,001$). Významné rozdíly mezi oběma skupinami byly od 1. hodiny a trvaly po celou dobu experimentu ($p < 0,001$) (Graf č. 5).

Graf č. 5. Změny hodnot plicní poddajnosti (CI) v čase a v jednotlivých skupinách.

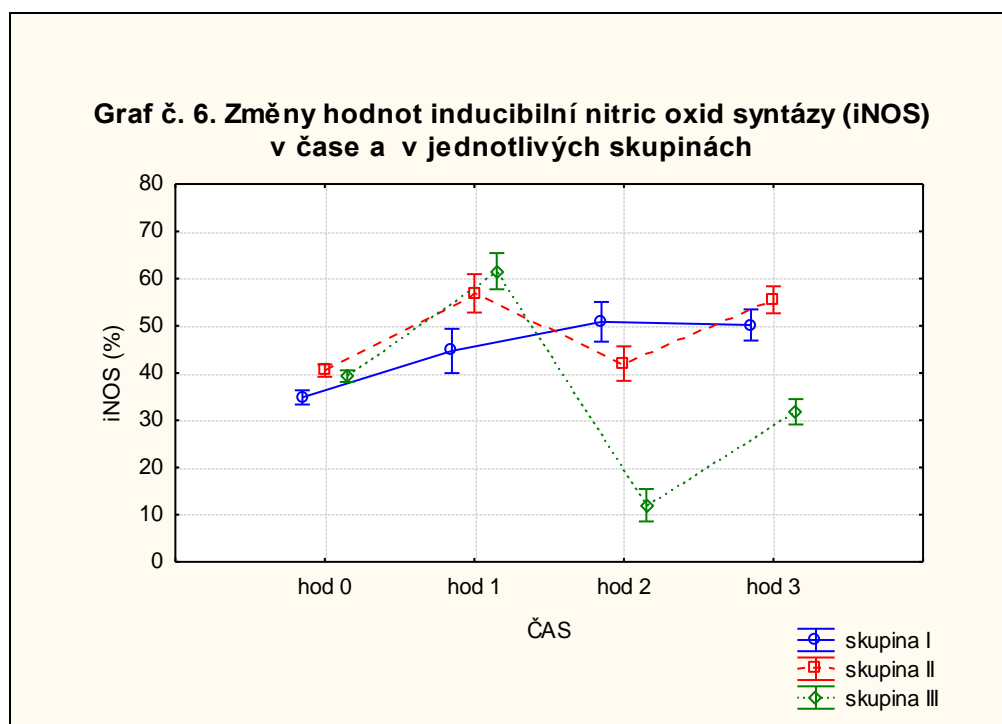


7.4. Určení produkce inducibilní nitric oxid syntázy (iNOS).

Nejnižší hodnota iNOS byla na počátku experimentu ve skupině I (ve srovnání se skupinou II resp. III $p = 0,04$ resp. $p = 0,01$). Ve stejné skupině byl významný vzestup pozorován v každé další hodině ve srovnání s 0. hod. ($p < 0,001$ resp. $p < 0,001$ resp. p

$< 0,001$). Mezi 2. a 3. hod. nedošlo k významnému vzestupu ($p = 0,79$). Ve skupině II byl významný vzestup patrný v 1. hod. ($p < 0,001$). Ve 2. hod následoval významný pokles, který nebyl významný ve srovnání s výchozí hodnotou ($p = 0,5$). Vzestup ve 3. hod. byl významný ve vztahu ke 2. a 0. hod., ($p < 0,001$), nebyl významný při srovnání s 1. hod. ($p = 0,5$). Ve skupině III byl patrný významný vzestup v 1. hod. ($p < 0,001$). Ve 2. hod došlo k poklesu ($p < 0,001$) s následujícím vzestupem. Konečná hodnota iNOS byla ve srovnání s 0 hod. významně nižší ($p < 0,001$). Při srovnávání iNOS ve skupinách mezi sebou na konci experimentu byla zjištěna nejvyšší hodnota ve skupině II (významnost srovnání skupin II vers. I, II vers. III a I vers. III byla $p = 0,02$ resp. $p < 0,001$ resp. $p < 0,001$) (Graf č. 6).

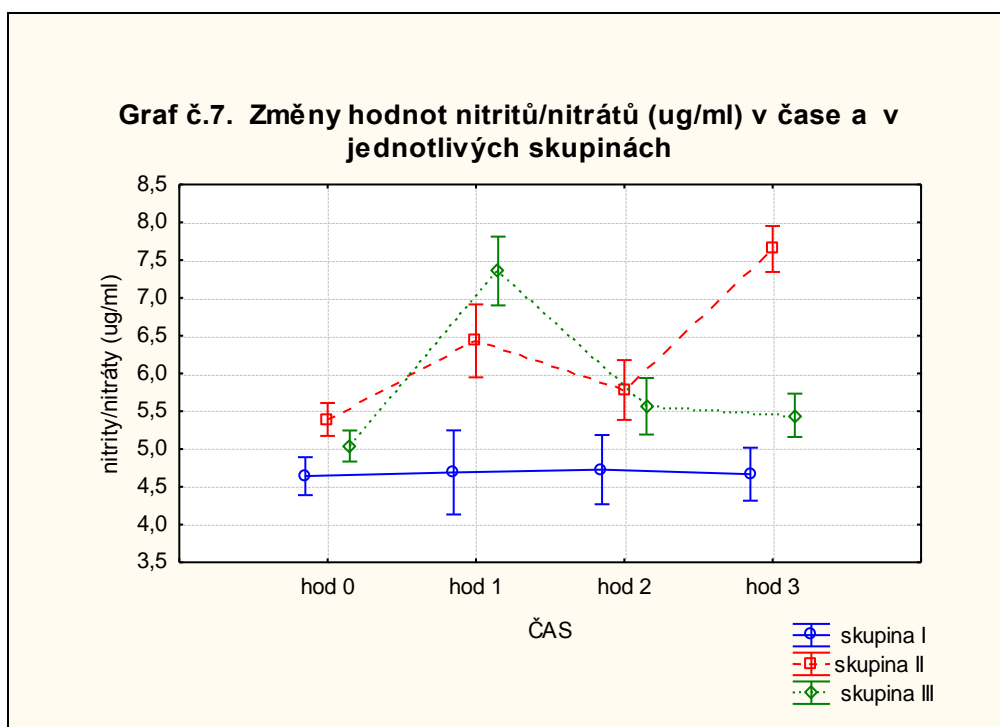
Graf č. 6. Změny hodnot indukibilní nitric oxid syntázy (iNOS) v čase a v jednotlivých skupinách.



7.5. Stanovení hladin nitrátů/nitritů.

Sledování hodnot NO je velmi obtížné pro jeho velkou reaktivitu, proto byly sledovány hodnoty uvedených metabolitů. Dynamika změn probíhala v souladu se změnami hodnot iNOS. Ve skupině I nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly během celého pokusu. Ve skupině II nastal významný vzestup v 1. hod. ($p < 0,001$), hodnoty ve 2. hod. byly významně nižší ve srovnání s 1. i 0. hod. ($p < 0,001$). Ve 3. hod došlo opět k vzestupu, který byl významný ve srovnání s předchozí hodinou ($p < 0,001$). Ve skupině III byl zjištěn vzestup v 1. hod ($p < 0,001$) s následným poklesem ve 2. hod ($p < 0,001$) i ve 3. hod.. Pokles ve 3. hod. ve srovnání s 2. hod významný nebyl ($p = 0,19$). Při srovnání skupin mezi sebou byly nejvyšší hodnoty nitritů/nitrátů zjištěny v 1. hod ve skupině II a III (skupina III vers. II, skupina III vers. I, skupina II vers I: $p < 0,001$ resp $p < 0,001$ resp. $p < 0,001$). Na konci experimentu byly nejvyšší hodnoty zjištěny ve skupině II. Ve skupině III byly hodnoty významně nižší ve srovnání se skupinou II ($p < 0,001$), přesto byly vyšší ve srovnání s počáteční stejnoskupinovou hodnotou ($p < 0,001$) (Graf č. 7).

Graf č. 7. Změny hodnot nitritů/nitrátů v čase a v jednotlivých skupinách.

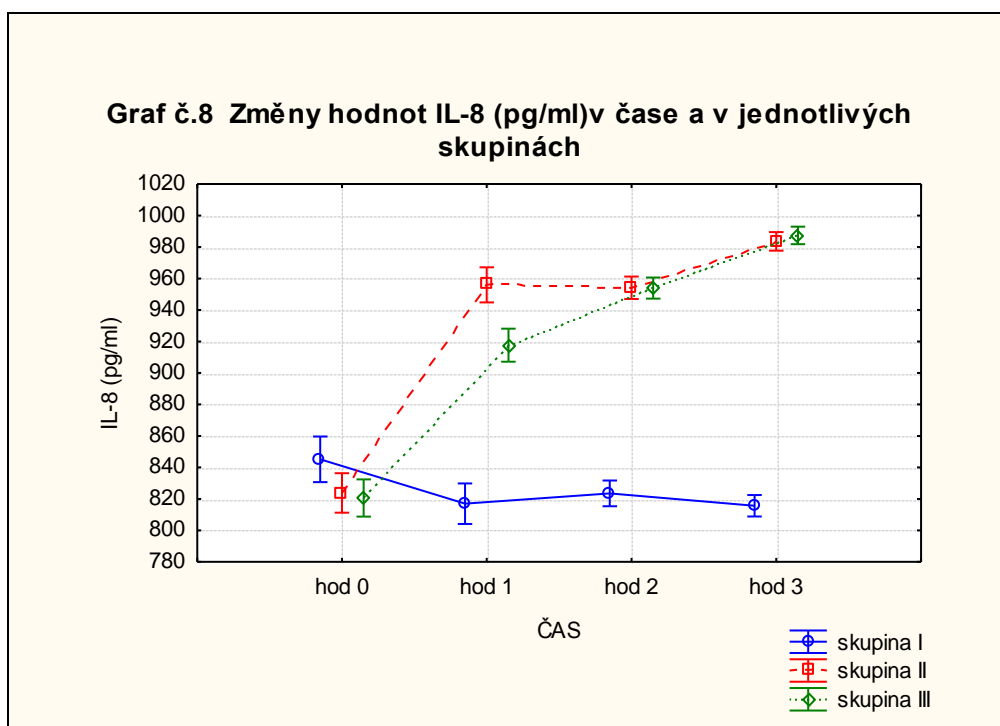


7.6 Sledování dynamiky IL-8.

Pokles IL-8 ve skupině I byl v 1. hod. významný ($p = 0,022$), hodnoty v následujících intervalech byly srovnatelné. Na konci experimentu byla hodnota IL-8 při srovnání 0. a 3. hod. významně nižší. Ve skupině II došlo k významnému vzestupu v 1. hod ($p < 0,001$). Ve 2. hod. došlo k poklesu, hodnota IL-8 však byla významně vyšší ve srovnání s 0. hod. ($p < 0,001$). Konečná hodnota ve 3. hod. byla významně zvýšena při srovnání s předchozí i s výchozí hodnotou ($p < 0,001$). Ve skupině III hodnoty plynule stoupaly a jejich vzestup byl mezi jednotlivými intervaly i ve vztahu k počáteční hodnotě jednoznačně významný ($p < 0,001$). Při hodnocení rozdílů mezi

jednotlivými skupinami byl zjištěn významný rozdíl mezi skupinou II a III se skupinou I a to již od 1. hod. průběhu. Mezi skupinou II a III nebyly od 2. hod. statistické rozdíly ($p = 0,23$) (Graf č. 8).

Graf č. 8. Změny hodnot IL-8 v čase a v jednotlivých skupinách.

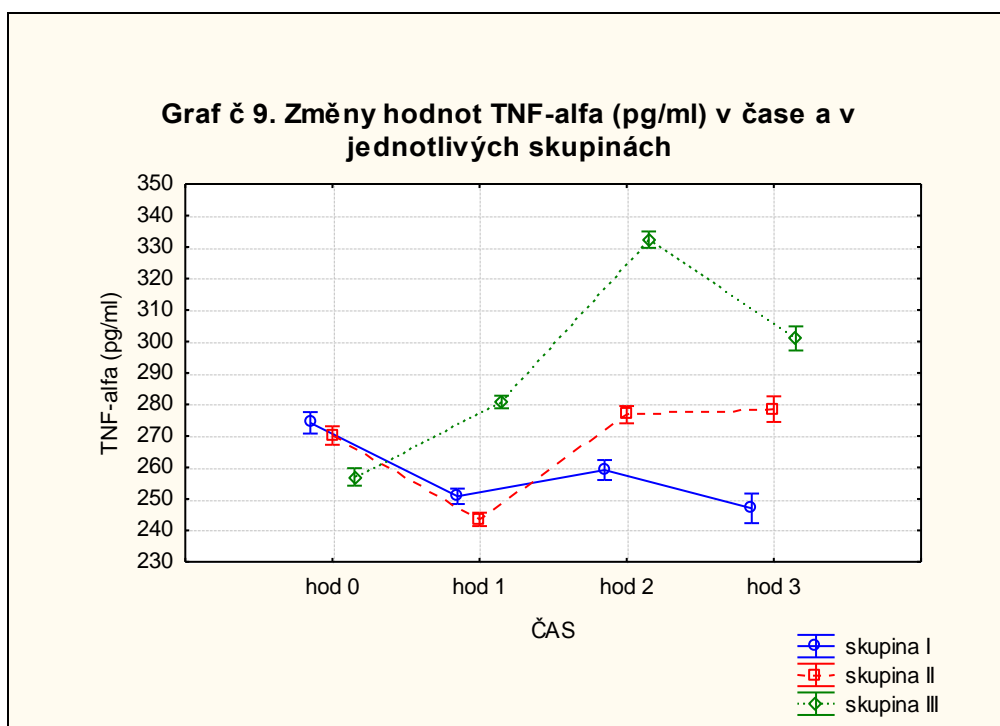


7.7 Průkaz dynamiky hodnot TNF- α .

Hodnoty TNF- α ve skupině I mírně klesaly. Ve 3. hod. byly ve srovnání s 0. hod. významně nižší ($p < 0,001$). Ve skupině II TNF- α v 1. hod kleslo ($p < 0,001$), po zbývajícím čas experimentu hladiny stoupaly. Hodnoty ve 3. hod. byly významně vyšší ve srovnání s 0. hod. ($p < 0,001$). Ve skupině III byl zaznamenán signifikantní vzestup

TNF- α od 0. hod. ($p < 0,001$) a trval do 2. hod. Pak nastal pokles, přesto hodnota TNF- α byla ve 3. hod. ve srovnání s 0. hod. významně vyšší ($p < 0,001$). Ve skupině III byla při srovnání s ostatními skupinami zjištěna nejvyšší hodnota TNF- α . (skupina III vers. skupina II, skupina III vers skupina I: v obou případech $p < 0,001$).

Graf č. 9. Změny hodnot TNF- α v čase a v jednotlivých skupinách.

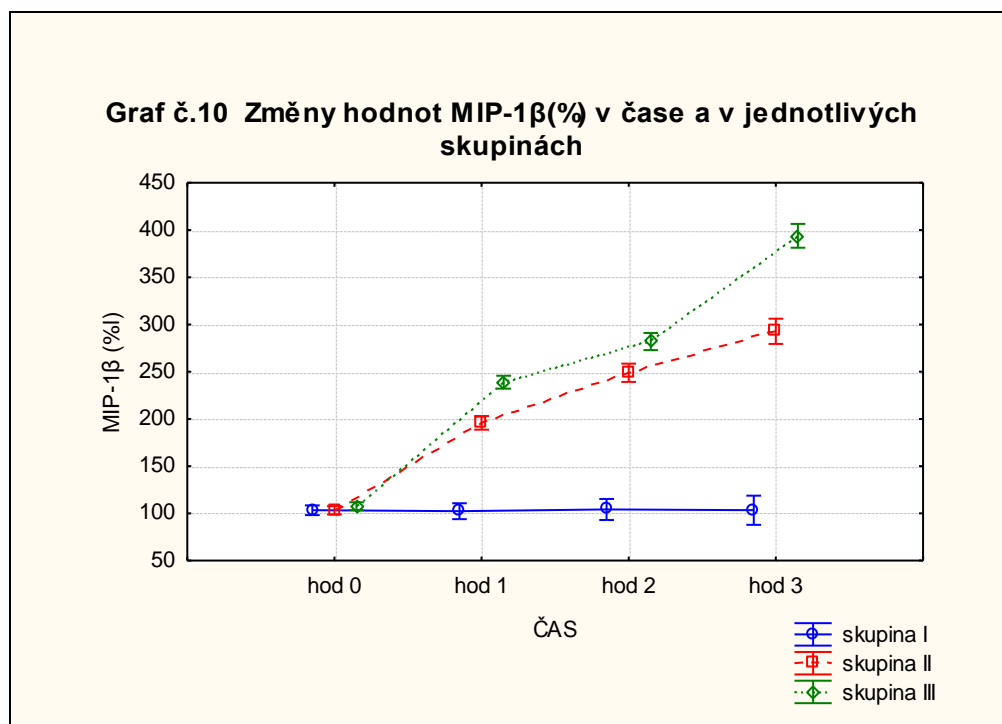


7.8 Sledování dynamiky hodnot MIP-1 β .

Změny hodnot MIP-1 β se ve skupině I významně neměnily během celého experimentu. K významným změnám došlo ve skupině II a III již od první hodiny umělé plicní ventilace (v obou skupinách srovnání mezi 1. a 0. hod. $p < 0,001$). Při srovnávání dosažených hodnot MIP-1 β mezi jednotlivými skupinami byla nejvyšší

hodnota zjištěna ve skupině III a to již od 1. hod. (při srovnávání jednotlivých skupin vždy $p < 0,001$ ve prospěch skupiny III) (Graf č. 9).

Graf č. 10. Změny hodnot MIP-1 β v čase a v jednotlivých skupinách.



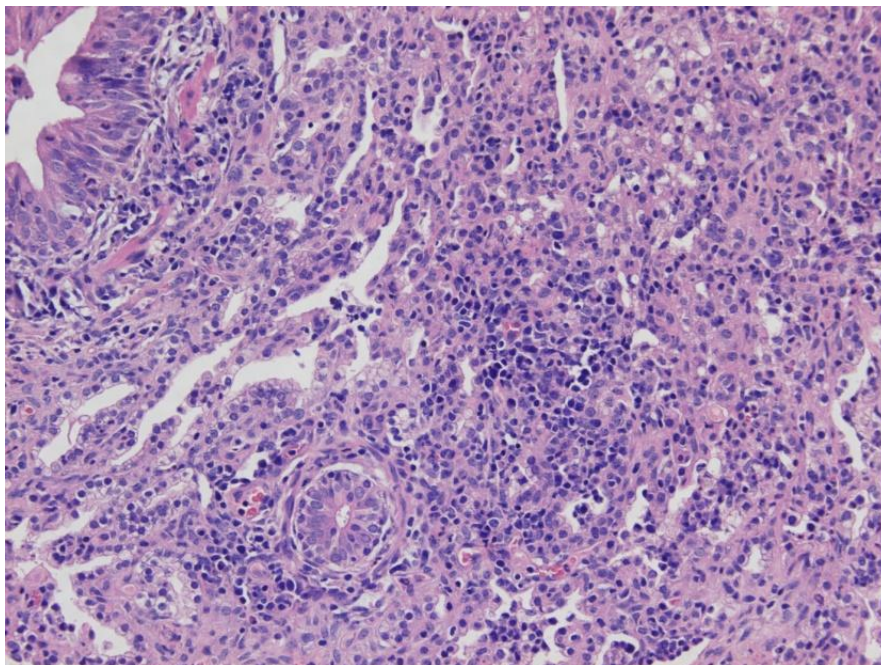
7.9 Patologickoanatomické vyšetření plicní tkáně.

Součástí uvedeného vyšetření byl makroskopický popis a následně provedené histologické vyšetření. U všech zvířat byl proveden odběr plicní tkáně před ukončením experimentu z thorakotomického přístupu. Plicní tkáň byla odebírána ze stejných okrsků plic. Ve skupině I byla makroskopicky patrná normální vzdušnost, plíce měly normální barvu. Při histologickém vyšetření byl patrný fyziologický nález na dýchacích cestách, fyziologická byla i alveolární cytoarchitektura.

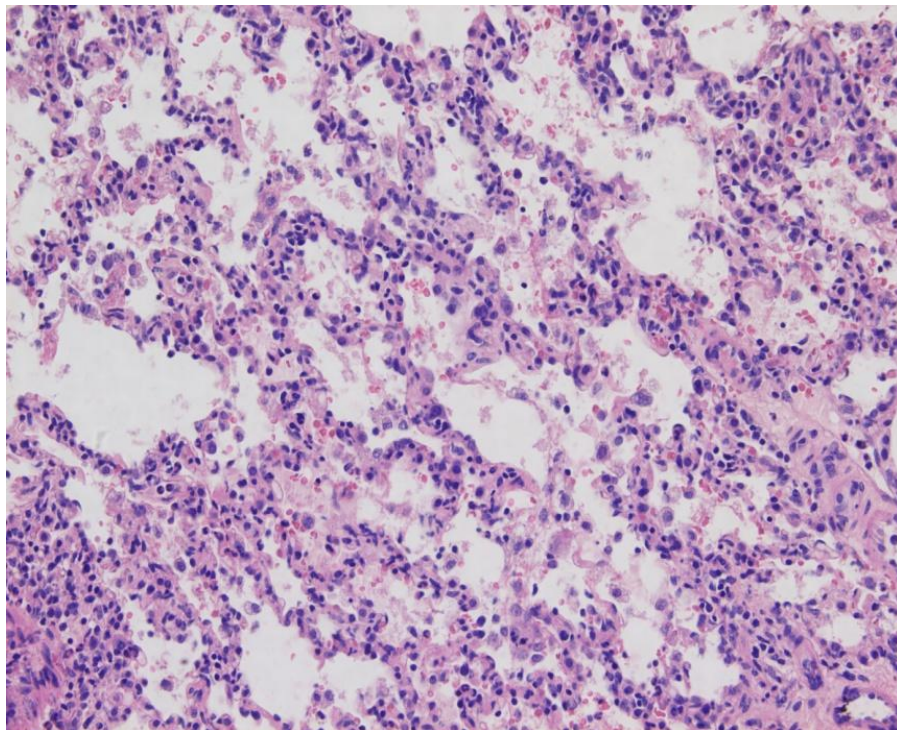
Ve skupině II byl popsán stejný nález jako ve skupině I včetně normální alveolární cytoarchitektury.

Největší změny byly popisovány ve skupině III. Na první pohled byly patrné nehomogenně aerované okrsky plicní tkáně, střídaly se okrsky s hyperinflací s okrsky kolabované tkáně. Při histologickém vyšetření byly zjištěny deformované alveoly, místy až štěrbinovitě zúžené s místy, kde byly naopak nápadně dilatované. Byl popisován perivaskulární edém, značná interstitiální celulisace, kde převládaly polymorfonukleáry, eosinofily a četné makrofágy. Maximální celulizace byla patrná kolem malých cév a terminálních bronchiolů. V některých alveolech byla hemoragická příměs (obr. č. 10 a obr. č. 11).

Obr. č. 10. Histologický nález plic zvířete ze skupiny III. Jsou patrné kolabované alveoly. (barvení: hematoxilin-eosin)



Obr. č. 11. Histologický nález plic u zvířete ze skupiny III. Je patrná značná zánětlivá celulizace interaveolárních sept. (barvení: hematoxilin- eosin)



8. Diskuze.

Cílem práce bylo prokázání vlivu traumaticky vedené umělé plicní ventilace na některé plicní funkce a na oběhový systém. Dalším cílem bylo zjištění rychlosti nástupu produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů v plicní tkáni prokazovaných v bronchoalveolární laváži a rozvoj zánětlivých změn v plicní tkáni. Dalším cílem bylo zjištění, zda zvýšená produkce uvedených cytokinů a chemokinů bude přítomna během celého experimentu. Jako kontrola byla sledována skupina zvířat spontánně ventilujících. Experiment byl proveden na praseti bílém, které je z hlediska fyziologie a patofyziologie velice blízké poměrům u člověka.

8.1 Vliv UPV na některé vitální a plicní funkce.

Změny HR, TK, CVP a plicní poddajnosti. Ve skupině spontánně dýchajících zvířat a ve skupině ventilovaných fyziologickými dechovými objemy se hodnoty uvedených parametrů neměnily, resp. změny nebyly statisticky významné. Není jednoznačné vysvětlení pro statisticky významnou diferenci TK_{diast.} ve III. skupině na počátku experimentu. Významné změny byly pozorovány ve skupině traumaticky ventilovaných zvířat. Pokles HR a TK byl patrný již v první hodině experimentu. Stejně tak vzestup CVP byl patrný již od 1. hod. pokusu. Změny lze vysvětlit jednak přímým vlivem ventilace na hemodynamiku (zvýšený nitrohruční a intraalveolární tlak, zhoršený žilní návrat) a jednak to může být již i vliv produkovaných a uvolněných cytokinů (TNF- α , IL-8, IL-1 β) v rámci procesu dekompartmentalizace, kdy se cytokiny dostávají z místa produkce (plíce) do systémového oběhu a do dalších distálních orgánů,

ve kterých vyvolávají jejich dysfunkci. Při postižení více orgánů dochází k rozvoji syndromu multiorgánové dysfunkce [74]. Pro verifikaci tohoto tvrzení chybí v naší práci laboratorní průkaz (průkaz elevace hladin cytokinů v séru), důkazy byly již publikovány [96]. Pozorované a prokázané změny jsou v soulase s výsledky jiných, dříve publikovaných prací [70, 71, 97, 98]. Stejně tak pokles plicní poddajnosti, který vznikl na podkladě morfologického poškození alveolů s následnou nestejnou aerací plic, intersticiálního a perivaskulárního edému a alveolárních hemoragií byl popsán i v jiných studiích. Avšak většina prací byla provedena na malých zvířatech (potkani), jen malá část experimentů včetně prezentovaného byla provedena na větších zvířatech [96, 98]. Výsledky předložené studie ukázaly, že i krátká doba traumaticky prováděné ventilace vedla velmi rychle ke zhoršení plicní mechaniky a ke snížení plicní poddajnosti.

8.2 Vztah UPV k produkci cytokinů, chemokinů iNOS a nitritů/nitrátů.

Inducibilní nitric oxid syntáza. iNOS je Ca^{2+} /kalmodulin nondependentní isoforma nitric oxid syntázy, jejíž produkce je transkripčně stimulována proinflamatorními cytokiny ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, interferon-gama- $\text{IFN-}\gamma$) a bakteriálním lipopolysacharidem. Zároveň je prokázano, že její transkripce se zvyšuje i mechanickým stimulem [99, 100]. Následná nadprodukce NO vede k tvorbě pernitritů, oxidativnímu stresu a tkáňovému poškození jaké bývá popisováno u ALI [101].

Ve skupině spontánně ventilujících zvířat bylo v první hodině pokusu prokázano statisticky významné zvýšení hodnot proteinu inducibilní NO syntázy, po zbývajících část pokusu se hodnoty neměnily, konečná hodnota byla vyšší ve srovnání s výchozí hodnotou. Stejně nálezy byly i u hladin nitrátů/nitritů. Ve skupině II došlo ke zvýšení

hodnot iNOS i nitritů/nitrátů v 1. hodině, následoval pokles a ve 3. hodině opět významný vzestup. Výrazné zvýšení iNOS bylo zaznamenáno ve skupině III v 1. hod. experimentu. Následoval výrazný pokles a opětovný vzestup. Hodnoty ve 3. hod. nedosáhly v této skupině výchozí hladiny. Hodnoty nitritů/nitrátů významně stouply v 1. hod., v dalším průběhu již jen klesaly.

Výsledky prací zabývajících se dynamikou změn produkce iNOS a koncových produktů metabolismu NO nitritů/nitrátů v závislosti na mechanickém stresu v důsledku traumaticky prováděné umělé plicní ventilace nejsou jednotné. Frank a kol. prokázali zvýšenou produkci proteinu iNOS v bronchoalveolární laváži u potkanů ventilovaných vysokým dechovým objemem ve srovnání se skupinou ventilovanou fyziologickým dechovým objemem [102]. Peng a kol. prokázali, že samotná umělá plicní ventilace prováděná velkými dechovými objemy (30ml/kg) vede u divokého typu zvířat ke zvýšení produkce iNOS, tvorbě NO a jeho koncových produktů nitritů/nitrátů. U těchto zvířat byla prokázána i zvýšená kapilární permeabilita, infiltrace neutrofilů a akumulace nitrotyrosinových produktů. U zvířat s konokautovým genem pro iNOS byla při stejném ventilačním režimu zjištěna významně snížená produkce nitritů/nitrátů a snížen rozsah kapilárního plicního leaku [103]. Hammerschmidt a spol. prokázali v izolovaných plicích potkanů ventilovaných vysokým dechovým objemem zvýšené hodnoty nitritů, nedetekovali však zvýšené hodnoty proteinu iNOS [104]. Stejně tak i práce Choi a kol. neprokázaly zvýšené hodnoty iNOS v plicích při umělé plicní ventilaci vedené dechovými objemy 20 ml/kg, avšak prokázaly zvýšené hodnoty eNOS v plicích a v ledvinách [105].

V našem experimentu byla dynamika hodnot iNOS a nitritů v souladu s převážnou částí publikovaných prací. U traumaticky ventilovaných zvířat byl velmi významný vzestup. Elevace, i když ne tak výrazná, ale zato plynulá, byla patrná i ve

skupině ventilovaných fyziologickým dechovým objemem. Pro výrazný pokles iNOS ve 2. hod. pokusu ve skupině III není jednoznačné vysvětlení. Z předchozích citací je patrné, že část prací zkoumajících produkci iNOS v souvislosti s umělou plicní ventilací vedenou velkými dechovými objemy, prokázaly zvýšenou produkci, avšak některé práce ji neprokázaly [104, 105]. Částečným vysvětlením může být buď určitá druhová nehomogenost publikovaných studií (studie byly prováděny na různých zvířatech - potkani, králíci, prasata), odlišné způsoby průkazu iNOS (vlastní průkaz iNOS proteinu, průkaz mRNA iNOS) a v neposlední řadě i standardisace BALu.

Úloha TNF- α v patogeneze plicního biotraumatu je stále diskutována. Jeho zvýšení bylo popsáno ve většině prací zabývajících se vlivem mechanické ventilace popř. jiných vyvolávajících příčin (deplece surfaktantu, vliv sepse) na jeho produkci [97, 106-108]. V experimentech, kde byly endotracheálně instilovány anti-TNF- α protilátky před prováděnou mechanickou ventilací byly prokázány snížené následky mechanického stresu na plicní tkáň a rozvoj plicního biotraumatu [109, 110].

I v našem experimentu provedeném na velkém zvířeti byl prokázán ve skupině ventilovaných vysokým dechovým objemem již na konci 1. hod. statisticky významný vzestup hladin TNF- α , který pokračoval i ve 2. hod. Ikdýž ve 3. hod. došlo k jeho poklesu, konečná hladina byla statisticky významně zvýšená ve srovnání s výchozí hodnotou. Ve skupině II byl vzestup nevýznamný během celého experimentu, ve skupině I hladiny TNF- α dokonce klesaly. Výsledky jsou v souladu s citovanými pracemi. Z literárních údajů a nakonec i z našich výsledků je patrné, že TNF- α je jedním z prvních cytokinů, který reaguje svým vzestupem kromě jiného i v důsledku mechanického stresu.

Většina experimentálních studií provedených in vitro, in vivo i ex vivo na různých živočišných druzích a při různých stimulačních mechanismech včetně umělé plicní

ventilace, prokázala vzestup IL-8 (u hlodavců je analogem IL-8 makrofágový inflamatorní protein (MIP-2) [111, 112]. IL-8 je velmi potentní granulocytární chemoatraktant a jeho úloha v rozvoji plicního barotraumatu je významná. V prezentované studii byl prokázán významný vzestup IL-8 od 1. hod. ve skupině II a III. Ve skupině I vzestup IL-8 prokázán nebyl. Znamená to, že i dechové objemy, které jsou považované jako fyziologické (7 ml/kg) způsobily takový mechanický stres, který vyvolal produkci IL-8. Tento nálezn je v souladu s některými pracemi [113, 114]. Naše práce prokázala vzestup IL-8 již po 1. hod. mechanické ventilace dechovými objemy 7 ml/kg. Jiné práce prokázaly vzestup IL-8 při umělé plicní ventilaci stejnými objemy až po 5 dnech ventilace [114]. V našem experimentu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami IL-8 ve skupině II a III. V obou skupinách došlo k elevaci IL-8, avšak traumaticky vedená ventilace nezvýšila významně jeho produkci. Srovnání hodnot IL-8 na konci experimentu neprokázalo ve skupině II a skupině III statisticky významný rozdíl. V soulase s citovanými pracemi lze potvrdit, že IL-8 je velice citlivý a včasný marker reagující svojí produkcí na mechanickou stimulaci plic. Nepodařilo se prokázat, že by traumaticky vedená UPV vedla k větší produkci IL-8.

Makrofágový inflamatorní protein 1- β (MIP-1 β) patřící do skupiny β -chemokinů je velmi silný atraktant pro imunokompetentní buňky zvl. pro makrofágy a některé typy lymfocytů. Úloha MIP-1 β v plicích byla zkoumána v kontextu s HIV infekcí [115]. Úloha MIP-1 β a MIP-1 α je popisována v souvislosti s regulací tvorby prozánětlivých cytokinů u malignit [116]. Zvýšené hodnoty MIP-1 β společně s dalšími C-C chemokiny (MIP-1 α) byly prokázány u dětí s cystickou fibrosou. Zvýšené hodnoty zmíněných chemokinů byly v korelaci s počty makrofágů [117]. Další skupinou nemocných s prokázanou zvýšenou produkcí byli nemocní se sarkoidosou a intersticiální fibrózou [118]. Elevace C-C chemokinů byla prokázána u novorozenců

s nízkou porodní hmotností, u kterých byl zjištěn rozvoj bronchopulmonální dysplázie [119]. Produkce MIP-1 β ve vztahu k mechanické stimulaci v rámci umělé plicní ventilace (mechanický stres) nebyla zatím předmětem publikací.

Ve skupině spontánně ventilujících zvířat se hodnoty MIP-1 β po celou dobu experimentu neměnily. Ve skupině II a skupině III došlo k významnému zvýšení hodnot MIP-1 β již v 1. hod. a každou následující hodinu hodnoty stoupaly. Ve skupině III byly hodnoty MIP-1 β signifikantně vyšší než ve skupině II a to již od první hodiny. Ze všech sledovaných cytokinů v BAL pouze MIP-1 β vykazoval nejvyšší hodnoty právě ve skupině traumaticky ventilovaných zvířat. Naše výsledky prokázaly, že kromě zánětlivého stimulu (literární údaje) i mechanický stres významnou měrou stimuluje produkci významného makrofágového chemoatraktantu MIP-1 β . Se zvyšujícím se mechanickým stresem (velikost TV) se přímo úměrně i zvyšovala produkce MIP-1 β . V tomto směru jde o první literární zmínku.

Výsledky histologických nálezů zjištěných v našem experimentu byly v kontextu s publikovanými a v této práci již citovanými pracemi. Nálezy ve skupině zvířat ventilovaných vysokým TV potvrdily, že tento způsob umělé plicní ventilace způsobuje edém interstitia, značnou zánětlivou celulizaci, dysrupci buněčných membrán a přestup tekutiny do alveolárního kompartmentu.

9. Závěr.

V práci byly stanoveny 3 hypotézy.

1. Byl stanoven předpoklad objevení se zánětlivých cytokinů a chemokinů v BALu již po první hodině traumaticky prováděné umělé plicní ventilace. Tento předpoklad byl splněn. Ve skupině ventilované vysokým dechovým objemem došlo v první hodině k významnému vzestupu TNF- α , IL-8 i MIP1- β . Byl prokázán i vzestup iNOS i jejích produktů (nitrátů a nitritů). U IL-8 došlo k vzestupu i ve skupině ventilované fyziologickým dechovým objemem. Pro pokles iNOS, nitrátů a nitritů od 2. hod. není jednoznačné vysvětlení. Významný je nálezní dynamiky MIP1- β ve vztahu k umělé plicní ventilaci jako jeho stimulátoru produkce, který zatím nebyl publikován.

2. Byl předpoklad, že produkce zánětlivých cytokinů a chemokinů u traumaticky prováděné ventilace bude trvale zvýšená po dobu trvání ventilace vysokými dechovými objemy. Tato hypotéza se potvrdila jen při sledování IL-8 a MIP1- β . U ostatních sledovaných parametrů byl počáteční vzestup následován významným poklesem.

3. Předpoklad, že traumaticky prováděná umělá plicní ventilace vede ke zhoršení parametrů plicních funkcí a má vliv i na oběhové parametry se splnil. Rychlost nástupu změn ve skupině III byl patrný již od ukončené 1. hod. a oběhová a ventilační deteriorace progredovala až do ukončení experimentu. Ve skupině 1 a 2 nebylo prokázáno zhoršení parametrů plicních funkcí a stejně tak nedošlo ke změnám hemodynamiky. Hypotéza byla správná.

Souhrnně lze na základě provedeného experimentu konstatovat, že traumaticky prováděná ventilace vede i na modelu velkého zvířete k tvorbě prozánětlivých cytokinů a chemokinů již během 1. hod. Dochází k velmi rychlému zhoršení plicních funkcí a oběhové deterioraci. Bylo prokázáno, že i mechanický stres je velmi účinným

stimulátorem produkce MIP1- β jednoho z nejvýznamnějších chemoatraktantů plicních makrofágů.

10. Přínos práce pro rozvoj vědní disciplíny a klinickou praxi.

Umělá plicní ventilace patří ke každodenní klinické praxi na jednotce intenzivní péče ve všech věkových obdobích. Závažné respirační selhání nutí v řadě případů použít takové parametry ventilační podpory, které navozují biotraumatické změny. Postižení plic a UPV, která je nezbytná pro zvládnutí respiračního selhání, se tak stávají motorem rozvíjejícího se multiorgánového selhání. Je snahou zjistit potenciální marker včasného plicního postižení. Na základě jeho průkazu by pak bylo možné upravit ventilační režim, popř. zařadit jinou formu ventilační, nebo ventilační a cirkulační podpory (ECMO), která by vedla ke snížení biotraumatického rizika. V práci jsme prokázali, že MIP1- β se objevuje již časně po zahájení UPV, zvl. pak pokud je UPV prováděna vysokými TV. Je však nutné provést ještě další experimenty, které by měly odpovědět na některé otázky jako např.:

1. Jaké hodnoty MIP1- β jsou již spojeny s přítomností vznikajícího plicního biotraumatu,
2. Při kterých hodnotách MIP1- β by měl být zvolen přechod na jiné formy ventilační podpory,
3. Zda mohou být určité hodnoty MIP1- β spojeny s ireverzibilním plicním postižením.

Na možnosti použití mimotělní membránové oxygenace jako jedné z metod léčby těžké dechové nedostatečnosti u dětí je upozorněno v příložené publikaci.

11. Seznam použité literatury.

1. Williams MC. Alveolar type I cells: Molecular phenotype and development. *Annual Review of Physiology*. 2003;65:669-695
2. Low FN. Electron microscopy of the rat lung. *Anat Rec*. 1952;113:437-49
3. Williams MC. Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:669-95
4. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis*. 1982;126:332-7
5. Chang Y, Mead D, Dhodda V, Brumm P, Fox BG. One-plasmid tunable coexpression for mycobacterial protein-protein interaction studies. *Protein Science*. 2009;18:2316-2325
6. Ma T, Yang B, Matthay MA, Verkman AS. Evidence against a role of mouse, rat, and two cloned human AQP1 isoforms as a water channel or a regulator of aquaporin-type water channels. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19:143-9
7. Zimmer G, Oeffner F, Von Messling V, Tschernig T, Groness HJ, Klenk HD, Herrler G. Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium. *Biochem J*. 1999;341 (Pt 2):277-84
8. Dobbs LG, Gonzalez RF, Allen L, Froh DK. HTI56, an integral membrane protein specific to human alveolar type I cells. *J Histochem Cytochem*. 1999;47:129-37
9. McElroy MC, Pittet JF, Hashimoto S, Allen L, Wiener-Kronish JP, Dobbs LG. A type I cell-specific protein is a biochemical marker of epithelial injury in a rat model of pneumonia. *Am J Physiol*. 1995;268:L181-6
10. McElroy MC, Pittet JF, Allen L, Wiener-Kronish JP, Dobbs LG. Biochemical detection of type I cell damage after nitrogen dioxide-induced lung injury in rats. *Am J Physiol*. 1997;273:L1228-34
11. Frank JA, Gutierrez JA, Jones KD, Allen L, Dobbs L, Matthay MA. Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:242-9
12. Newman V, Gonzalez RF, Matthay MA, Dobbs LG. A novel alveolar type I cell-specific biochemical marker of human acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;161:990-995
13. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*. 2002;54:431-67

14. Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H, Jr., Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol.* 2002;22:2329-44
15. Borok Z, Lubman RL, Danto SI, Zhang XL, Zabski SM, King LS, Lee DM, Agre PC, Randall ED. Keratinocyte growth factor modulates alveolar epithelial cell phenotype in vitro: expression of aquaporin 5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;18:554-61
16. Boucher RC. Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. *J Physiol.* 1999;516 (Pt 3):631-8
17. Carter EP, Matthay MA, Farinas J, Verkman AS. Transalveolar osmotic and diffusional water permeability in intact mouse lung measured by a novel surface fluorescence method. *J Gen Physiol.* 1996;108:133-42
18. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem.* 1999;274:20071-4
19. Ma T, Song Y, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4386-91
20. Ma T, Fukuda N, Song Y, Matthay MA, Verkman AS. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J Clin Invest.* 2000;105:93-100
21. Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1966-71
22. Takayasu H, Nakazawa N, Montedonico S, Puri P. Reduced expression of aquaporin 5 water channel in nitrofen-induced hypoplastic lung with congenital diaphragmatic hernia rat model. *J Pediatr Surg.* 2007;42:415-9
23. Burgos CM, Uggle AR, Fagerstrom-Billai F, Eklof AC, Frenckner B, Nord M. Gene expression analysis in hypoplastic lungs in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 45:1445-54
24. McAuley DF, Matthay MA. Clara cell protein CC16. A new lung epithelial biomarker for acute lung injury. *Chest.* 2009;135:1408-10
25. Kropski JA, Fremont RD, Calfee CS, Ware LB. Clara cell protein (CC16), a marker of lung epithelial injury, is decreased in plasma and pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury. *Chest.* 2009;135:1440-7
26. Macklin CC. The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes. *Lancet.* 1954;266:1099-1104
27. Mason RJ, Dobbs LG, Greenleaf RD, Williams MC. Alveolar type II cells. *Fed Proc.* 1977;36:2697-702

28. Mason RJ, Williams MC. Type II alveolar cell. Defender of the alveolus. *Am Rev Respir Dis.* 1977;115:81-91
29. Mason RJ, Williams MC, Greenleaf RD, Clements JA. Isolation and properties of type II alveolar cells from rat lung. *Am Rev Respir Dis.* 1977;115:1015-26
30. Daniels CB, Lopatko OV, Orgeig S. Evolution of surface activity related functions of vertebrate pulmonary surfactant. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998;25:716-21
31. Sullivan LC, Daniels CB, Phillips ID, Orgeig S, Whitsett JA. Conservation of surfactant protein A: evidence for a single origin for vertebrate pulmonary surfactant. *J Mol Evol.* 1998;46:131-8
32. Fabisiak JP, Vesell ES, Rannels DE. Interactions of beta adrenergic antagonists with isolated rat alveolar type II pneumocytes. II. Receptor-independent accumulation of beta adrenergic antagonists and other cationic amphiphilic drugs in lamellar bodies. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987;241:728-35
33. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995;9:484-96
34. Nishizuka Y, Nakamura S. Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1995;22:S202-3
35. Chander A, Fisher AB. Regulation of lung surfactant secretion. *Am J Physiol.* 1990;258:L241-53
36. Mason RJ, Voelker DR. Regulatory mechanisms of surfactant secretion. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1408:226-40
37. Ashino Y, Ying X, Dobbs LG, Bhattacharya J. $[Ca^{2+}]_i$ oscillations regulate type II cell exocytosis in the pulmonary alveolus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L5-13
38. Koval M. Sharing signals: connecting lung epithelial cells with gap junction channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283:L875-93
39. Paemeleire K, Martin PE, Coleman SL, Fogarty KE, Carrington WA, Leybaert L, Tuft RA, Evans WH, Sanderson MJ. Intercellular calcium waves in HeLa cells expressing GFP-labeled connexin 43, 32, or 26. *Mol Biol Cell.* 2000;11:1815-27
40. Froh D, Ballard PL, Williams MC, Gonzales J, Goerke J, Odom MW, Gonzales LW. Lamellar bodies of cultured human fetal lung: content of surfactant protein A (SP-A), surface film formation and structural transformation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1052:78-89
41. Gross NJ, Kellam M, Young J, Krishnasamy SD, Hand R. Separation of alveolar surfactant into subtypes. A comparison of methods. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:617-22

42. deMello DE, Heyman S, Phelps DS, Floros J. Immunogold localization of SP-A in lungs of infants dying from respiratory distress syndrome. *Am J Pathol.* 1993;142:1631-40
43. Korfhagen TR, LeVine AM, Whitsett JA. Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1408:296-302
44. Korfhagen TR, Sheftelyevich V, Burhans MS, Bruno MD, Ross GF, Wert SE, Stahlman MT, Jobe AH, Ikegami M, Whitsett JA, Fisher JH. Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. *J Biol Chem.* 1998;273:28438-43
45. Nicholas TE. Pulmonary surfactant: no mere paint on the alveolar wall. *Respirology.* 1996;1:247-57
46. Breslin JS, Weaver TE. Binding, uptake, and localization of surfactant protein B in isolated rat alveolar type II cells. *Am J Physiol.* 1992;262:L699-707
47. Pinto RA, Wright JR, Lesikar D, Benson BJ, Clements JA. Uptake of pulmonary surfactant protein C into adult rat lung lamellar bodies. *J Appl Physiol.* 1993;74:1005-11
48. Godiska R, Dhodda V, Gilbert V, Ravin N, Mead D. Novel linear vector for cloning "unclonable" DNAs and constructing dual-insert libraries. *Plasmid.* 2007;57:238-238
49. Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR. Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:5566-70
50. Horowitz AD, Moussavian B, Whitsett JA. Roles of SP-A, SP-B, and SP-C in modulation of lipid uptake by pulmonary epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* 1996;270:L69-79
51. Baritussio A, Alberti A, Armanini D, Meloni F, Bruttomesso D. Different pathways of degradation of SP-A and saturated phosphatidylcholine by alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L91-9
52. Reed JA, Whitsett JA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and pulmonary surfactant homeostasis. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998;110:321-32
53. Marin L, Dameron F, Relier JP. Changes in the cellular environment of differentiating type II pneumocytes. Quantitative study in the perinatal rat lung. *Biol Neonate.* 1982;41:172-82
54. Strayer DS, Pinder R, Chander A. Receptor-mediated regulation of pulmonary surfactant secretion. *Exp Cell Res.* 1996;226:90-7
55. Bonner JC. Mesenchymal cell survival in airway and interstitial pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 3:15
56. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214:199-210
57. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:471-501

58. Dunn IPugin J. Mechanical ventilation of various human lung cells in vitro: identification of the macrophage as the main producer of inflammatory mediators. *Chest*. 1999;116:95S-97S
59. Lentsch AB, Czermak BJ, Bless NM, Van Rooijen NWard PA. Essential role of alveolar macrophages in intrapulmonary activation of NF-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20:692-8
60. Vazquez-Prokopec GM, Eng JV, Kelly R, Mead D, Kolhe P, Chaves LF, Burkot TKitron U. Spatial Clustering of West Nile Virus Infection Is Associated with Combined Sewer Overflow Creeks in Urban Atlanta, Georgia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;81:168-168
61. Pugin J, Verghese G, Widmer MCMatthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1999;27:304-12
62. Asada K, Sasaki S, Suda T, Chida KNakamura H. Antiinflammatory roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:195-200
63. Li LF, Yu LQuinn DA. Ventilation-induced neutrophil infiltration depends on c-Jun N-terminal kinase. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:518-24
64. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, Phillips RJStrieter RM. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest*. 2002;110:1703-16
65. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP, 3rd, Xue YY, Li K, Ross DJStrieter RM. Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Immunol*. 2002;169:1037-49
66. Belperio JA, Keane MP, Iii JPLStrieter RM. The role of cytokines during the pathogenesis of ventilator-associated and ventilator-induced lung injury. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;27:350-364
67. Downey GP, Dong Q, Kruger J, Dedhar SCerapanov V. Regulation of neutrophil activation in acute lung injury. *Chest*. 1999;116:46S-54S
68. Beck GC, Yard BA, Breedijk AJ, Van Ackern KVan Der Woude FJ. Release of CXC-chemokines by human lung microvascular endothelial cells (LMVEC) compared with macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1999;118:298-303
69. Webb HHTierney DF. Perivascular Pulmonary Edema in Rats after Positive Pressure Ventilation and Positive End-Expiratory Pressure (Peep). *American Review of Respiratory Disease*. 1972;105:982-&
70. Webb HHTierney DF. Experimental Pulmonary-Edema Due to Intermittent Positive Pressure Ventilation with High Inflation Pressures. Protection by Positive End-Expiratory Pressure. *American Review of Respiratory Disease*. 1974;110:556-565

71. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High Inflation Pressure Pulmonary-Edema - Respective Effects of High Airway Pressure, High Tidal Volume, and Positive End-Expiratory Pressure. *American Review of Respiratory Disease*. 1988;137:1159-1164
72. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G. Permeability Pulmonary-Edema Due to Ventilation with High Peak Pressure Is Related to Changes in Volume, Not in Pressure. *American Review of Respiratory Disease*. 1986;133:A266-A266
73. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G. Intermittent Positive-Pressure Hyperventilation with High Inflation Pressures Produces Pulmonary Microvascular Injury in Rats. *American Review of Respiratory Disease*. 1985;132:880-884
74. Halbertsma FJJ, Vaneker M, Scheffer GJ, van der Hoeven JG. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. *Netherlands Journal of Medicine*. 2005;63:382-392
75. Crimi E, Zhang HB, Han RNN, Del Sorbo L, Ranieri VM, Slutsky AS. Ischemia and reperfusion increases susceptibility to ventilator-induced lung injury in rats. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;174:178-186
76. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2000;284:43-44
77. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;109:699-705
78. Lellouche F, Dionne S, Simard S, Bussières JD, Dagenais F. High Tidal Volumes in Mechanically Ventilated Patients Increase Organ Dysfunction after Cardiac Surgery. *Anesthesiology*. 2012;116:1072-1082
79. Schmitz ML, Baeuerle PA. The P65 Subunit Is Responsible for the Strong Transcription Activating Potential of Nf-Kappa-B. *Embo Journal*. 1991;10:3805-3817
80. Tremblay LN, Miatto D, Hamid Q, Govindarajan AS, Slutsky AS. Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 messenger RNA. *Critical Care Medicine*. 2002;30:1693-1700
81. Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, Chevrolet JC. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1998;19:L1040-L1050
82. Lim LH, KWagner EM. Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;168:1068-1074
83. Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz EB, Bryan AC. Effect of Granulocyte Depletion in a Ventilated Surfactant-Depleted Lung. *Journal of Applied Physiology*. 1987;62:27-33

84. MatuteBello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, Chi EY, Hudson LD Martin TR. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997;156:1969-1977
85. Oei J, Lui K, Wang HH Henry R. Decreased neutrophil apoptosis in tracheal fluids of preterm infants at risk of chronic lung disease. *Archives of Disease in Childhood*. 2003;88:245-249
86. Kotecha S, Mildner RJ, Prince LR, Vyas JR, Currie AE, Lawson RA Whyte MKB. The role of neutrophil apoptosis in the resolution of acute lung injury in newborn infants. *Thorax*. 2003;58:961-967
87. Everard ML, Sly P, Brenan SR Ryan G. Macrolide antibiotics in diffuse panbronchiolitis and in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. 1997;10:2926-2926
88. Zamir E Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*. 2001;114:3583-3590
89. Wang JG, Miyazu M, Xiang P, Li SN, Sokabe MNaruse K. Stretch-induced cell proliferation is mediated by FAK-MAPK pathway. *Life Sciences*. 2005;76:2817-2825
90. Wang JG, Miyazu M, Matsushita E, Sokabe MNaruse K. Uniaxial cyclic stretch induces focal adhesion kinase (FAK) tyrosine phosphorylation followed by mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;288:356-361
91. Banes AJ, Tsuzaki M, Yamamoto J, Fischer T, Brigman B, Brown TMiller L. Mechanoreception at the cellular level: The detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*. 1995;73:349-365
92. Gillespie PG Walker RG. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*. 2001;413:194-202
93. Jijon HB, Panenka WJ, Madsen KL Parsons HG. MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2002;283:C31-C41
94. Jijon HB, Allard B, Russo MP Jobin C. NF-kappa B-inducing kinase (NIK) triggers NF-kappa B transcriptional activity and prevents Fas and TNF-induced apoptosis through a p38 dependent RelA phosphorylation pathway. *Gastroenterology*. 2004;126:A42-A42
95. Chiang CH, Pai HI Liu SL. Ventilator-induced lung injury (VILI) promotes ischemia/reperfusion lung injury (I/R) and NF-kB antibody attenuates both injuries. *Resuscitation*. 2008;79:147-154
96. Kobr J, Kuntscher V, Treska V, Molacek J, Vobruba V, Fremuth J, Racek J, Trefil L Kocova J. Adverse effects of the high tidal volume during mechanical ventilation of normal lung in pigs. *Bratislava Medical Journal-Bratislavske Lekarske Listy*. 2008;109:45-51

97. Whitehead TC, Zhang HB, Mullen BS, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on cytokine response to intratracheal lipopolysaccharide. *Anesthesiology*. 2004;101:52-58
98. Hoegl S, Boost KA, Flondor M, Scheiermann P, Muhl H, Pfeilschifter J, Zwissler B, Hofstetter C. Short-term exposure to high-pressure ventilation leads to pulmonary biotrauma and systemic inflammation in the rat. *International Journal of Molecular Medicine*. 2008;21:513-519
99. Gosgnach W, Messika-Zeitoun D, Gonzalez W, Philippe M, Michel JB. Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2000;279:C1880-C1888
100. Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T. Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002;17:1015-1025
101. Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain S, N. A. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998;158:1883-1889
102. Frank JA, Pittet JF, Lee H, Godzich M, Matthay MA. High tidal volume ventilation induces NOS2 and impairs cAMP-dependent air space fluid clearance. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2003;284:L791-L798
103. Peng XQ, Abdulnour REE, Sammani S, Ma SF, Han EJ, Hasan EJ, Tudor R, Garcia JG, N. Hassoun PM. Inducible nitric oxide synthase contributes to ventilator-induced lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005;172:470-479
104. Hammerschmidt S, Schiller J, Kuhn H, Meybaum M, Gessner C, Sandvoss T, Arnold K, Wirtz H. Influence of tidal volume on pulmonary NO release, tissue lipid peroxidation and surfactant phospholipids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2003;1639:17-26
105. Choi WI, Quinn DA, Park KM, Moufarrej RK, Jafari B, Syrkina O, Bonventre J, V. Hales CA. Systemic microvascular leak in an in vivo rat model of ventilator-induced lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;167:1627-1632
106. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li JF, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99:944-952
107. Ricard J, D. Dreyfuss D. Cytokines during ventilator-induced lung injury: A word of caution. *Anesthesia and Analgesia*. 2001;93:251-252
108. Stuber F, Wrigge H, Schroeder S, Wetegrove S, Zinserling J, Hoeft A, Putensen C. Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. *Intensive Care Medicine*. 2002;28:834-841

109. Wilson MR, Choudhury STakata M. Stretch induced pulmonary oedema is mediated by tumour necrosis factor receptor I signalling in mice. *Thorax*. 2005;60:ii15-ii15
110. Imai Y, Kawano T, Iwamoto S, Nakagawa S, Takata MMiyasaka K. Intratracheal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody attenuates ventilator-induced lung injury in rabbits. *Journal of Applied Physiology*. 1999;87:510-515
111. Held HD, Boettcher S, Hamann LUhlig S. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear Factor-kappa B and is blocked by steroids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001;163:711-716
112. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AHHubmayr RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1999;277:L167-L173
113. Wilson MR, Choudhury S, Goddard ME, O'Dea KP, Nicholson AGTakata M. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *Journal of Applied Physiology*. 2003;95:1385-1393
114. Lin CY, Zhang HB, Cheng KCSlutsky AS. Mechanical ventilation may increase susceptibility to the development of bacteremia. *Critical Care Medicine*. 2003;31:1429-1434
115. Caufour P, Le Grand R, Cheret A, Neildez O, Theodoro F, Boson B, Vaslin BDormont D. Secretion of beta-chemokines by bronchoalveolar lavage cells during primary infection of macaques inoculated with attenuated nef-deleted or pathogenic simian immunodeficiency virus strain mac251. *Journal of General Virology*. 1999;80:767-776
116. Nath A, Chattopadhyay S, Chattopadhyay USharma NK. Macrophage inflammatory protein (MIP)1 alpha and MIP1 beta differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2006;55:1534-1541
117. Brennan S, Sly PD, Gangell CL, Sturges N, Winfield K, Wikstrom M, Gard S, Upham JWCf A. Alveolar macrophages and CC chemokines are increased in children with cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2009;34:655-661
118. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc JStriz I. Cytokine gene polymorphisms and BALF cytokine levels in interstitial lung diseases. *Respiratory Medicine*. 2009;103:773-779
119. Baier RJ, Majid A, Parupla H, Loggins JKruiger TE. CC chemokine concentrations increase in respiratory distress syndrome and correlate with development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonology*. 2004;37:137-148

Pozn. Ke kapitole „Historické poznámky k vývoji umělé plicní ventilace“ byl použit literární zdroj z: Pavel Dostál a kol. *Základy umělé plicní ventilace*. Maxdorf Jessenius, 2004

12. Přílohy.

Příloha 1.:

Vobruba V., Klimenko OV., Kobr J., Cerna O., Pokorna P., Mikula I., Hridel J., Brantova O., Martasek P. Effects of high tidal volume mechanical ventilation on production of cytokines, iNOS, and MIP-1 β proteins in pigs. Experimental Lung Research. Accepted 3 Oct.2012

Příloha 2.

Klimenko OV., Vobruba V., Martasek P. Influence of the lung mechanical ventilation with injurious parameters on 7-ketocholesterol synthesis in Sus Scrofa. BMB Rep. 2010 Apr;(4):257-62

Příloha 3

Vobruba V., Černá O., Lorenčík D., Pokorná P., Srnský P., Rohn V., Vykydal I., Mlejnský F., Fichtl J., Hodková G., Nikitinský D., Janota J., Tláskal T., Matějska T., Rygl M., Bělohávek J. ECMO (extrakorporální membránová oxygenace v léčbě respiračního a oběhového selhání u novorozenců a dětí.. Čes-slov pediat 2012;67(suppl):6-12